

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη των bHLH-Orange πρωτεϊνών στη *Drosophila melanogaster*:

- A) Τρόπος δράσης των *E(spl)* γονιδίων κατά τη νευρογένεση
- B) Ανάλυση του προτύπου έκφρασης του γονιδίου *Hey* και της σχέσης του με το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch

ΝΙΚΟΣ Ι. ΓΙΑΓΤΖΟΓΛΟΥ
ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2004

*Στους γονείς μου Γιάννη και Ζωή
Στη σύντροφό μου Χριστίνα Μπαριτάκη
Στον φίλο μου Γιώργο Σιανίδη*

Ευχαριστίες	6
Περίληψη	9
Abstract.....	10
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ (ΜΕΡΟΣ Α).....	11
1.1 Νευρογένεση στη <i>Drosophila melanogaster</i>	11
1.2 Το εμβρυϊκό κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) της <i>Drosophila melanogaster</i> . Χαρακτηριστικά των νευροβλαστών.	11
1.3 Το περιφερικό νευρικό σύστημα (ΠΝΣ) της <i>Drosophila melanogaster</i>	14
1.4 Γενετική βάση της νευρογένεσης.....	16
1.5 Συνοπτική περιγραφή και κατηγοριοποίηση των πρωτεϊνών HLH.	17
1.6 Τα προνευρικά γονίδια.....	22
1.7 Το Notch σηματοδοτικό μονοπάτι.	23
1.7.1 Ο υποδοχέας Notch και οι δεσμευτές Delta και Serrate.....	23
1.7.2 Η σηματοδότηση Notch.....	24
1.8 Το γονιδιακό σύμπλοκο E(spl)-C.	26
1.8.1 Χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών E(spl).....	27
1.9 Μοντέλο πλευρικής αναστολής κατά το διαχωρισμό του Πρόδρομου Αισθητηρίου Οργάνου κατά την ανάπτυξη τού ΠΝΣ.	28
1.10 Μηχανισμοί δράσης των πρωτεϊνών E(spl).	31
2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ (ΜΕΡΟΣ Β).....	32
2.1 Πρωτεΐνες Hey και σηματοδότηση Notch.....	32
2.2 Δομικές ομοιότητες και διαφορές πρωτεϊνών Hey-Hes. Κατάταξη των πρωτεϊνών bHLH Hey.....	34
2.3 Ειδικότητα πρόσδεσης των πρωτεϊνών Hey.	36
2.4 Μηχανισμοί καταστολής από τις πρωτεΐνες Hey.....	36
2.5 Πρωτεΐνες Hey: στόχοι και διεκπεραιωτές του Notch μονοπατιού;	38
2.6 Πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών Hey και ο αναπτυξιακός τους ρόλος.	42
2.6.1 Πρωτεΐνες Hey και σωματογένεση.	42
2.6.2 Πρωτεΐνες Hey και νευρογένεση.	43
2.6.3 Πρωτεΐνες Hey και γλοιογένεση.	44
2.6.4 Πρωτεΐνες Hey και ανάπτυξη του καρδιαγγειακού συστήματος.....	44
2.6.5 Πρωτεΐνες Hey και μυογένεση.....	46
2.6.6 Πρότυπο έκφρασης σε άλλα σπονδυλωτά.....	46
2.7 Λειτουργική σχέση των πρωτεϊνών Hey και Hes.	47
2.8 Γονίδια στόχοι των Hey πρωτεϊνών.	48
3 Στόχοι της εργασίας.....	49

4	Υλικά και Μέθοδοι:	50
4.1	Πλασμιδιακές κατασκευές, τεχνικές κλωνοποίησης και μέθοδοι χειρισμού DNA.	50
4.2	Δημιουργία διαγενετικών στελεχών <i>Drosophila</i> .	50
4.3	Ιστοχημικές και ανοσοιστοχημικές χρώσεις σε έμβρυα και ιστούς <i>Drosophila</i> .	51
4.4	Παραγωγή και καθαρισμός της πρωτεΐνης His-Hey με χρωματογραφία συγγένειας μετάλλου.	52
4.5	Σύστημα δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	53
4.6	Ανάλυση αλληλεπιδράσεων ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών, παρηγμένων <i>in vitro</i> , με GST πρωτεΐνες.	53
4.7	Πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων S2.	54
5	Αποτελέσματα (Μέρος A)	56
5.1	Οι πρωτεΐνες E(spl) καταστέλλουν γονίδια στόχους των προνευρικών πρωτεϊνών.	56
5.2	Ορισμένες πρωτεΐνες E(spl) μπορούν να καταστείλουν γονίδια στόχους χωρίς πρόσδεση στο DNA.	58
5.3	Η E(spl)m7 προσδένεται σε E _A αλληλουχίες μέσω προνευρικών πρωτεϊνών.	65
5.4	Άμεση ή έμμεση πρόσδεση των πρωτεϊνών E(spl) σε γονίδια στόχους.	70
5.5	Η καταστολή της μεταγραφής από την E(spl)m7 απαιτεί τον συγκαταστολέα Groucho.	72
5.6	Ταυτοποίηση των περιοχών αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών Sc και E(spl)m7.	74
5.7	Το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης Scute είναι περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής.	77
5.8	Η περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής της πρωτεΐνης Sc καταστέλλεται από τις πρωτεΐνες E(spl).	79
5.9	Εξέταση μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης E(spl)m7. Ρόλος της Orange περιοχής και εξάρτηση της κατασταλτικής λειτουργίας από την πρωτεΐνη Groucho.	82
5.10	Πιθανός ρόλος της περιοχής ενεργοποίησης της μεταγραφής της πρωτεΐνης Sc στην καταστολή από E(spl)m7 <i>in vivo</i> .	85
6	Αποτελέσματα (Μέρος B)	88
6.1	Εξέταση του προτύπου έκφρασης του Hey.	88
6.2	Εμβρυικό πρότυπο έκφρασης του γονιδίου Hey.	88
6.3	Πρότυπο έκφραση του γονιδίου Hey στην προνύμφη.	94
6.4	Πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης στο στάδιο της νύμφης.	98
6.5	Απόκριση του γονιδίου στο σήμα Notch.	100
7	Συζήτηση (μέρος A)	102
7.1	Στόχοι της δράσης των E(spl) πρωτεϊνών.	102
7.2	Διπλός τρόπος δράσης των E(spl) πρωτεϊνών επί των γονιδίων στόχων.	104
7.3	Ανάλυση του αλληλεπίδρασης των E(spl)m7 και της Sc πρωτεϊνών.	106

7.4	Η σημασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης Scute και της bHLH περιοχής της πρωτεΐνης E(spl)m7.....	107
7.5	Συνέπειες για τον μηχανισμό της πλευρικής αναστολής.....	111
7.6	Μελλοντικές προοπτικές.....	112
8	Συζήτηση (μέρος Β).....	113
8.1	Το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου Hey.....	113
8.2	Το γονίδιο Hey ως άμεσος μεταγραφικός στόχος του Notch.....	113
8.3	Η λειτουργία του γονιδίου Hey.....	114
9	Βιβλιογραφία.....	116

Ευχαριστίες

Πρωταρχικά θέλω να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου Χρήστο Δελιδάκη για τις συμβουλές και την πραγματικά πολύτιμη στήριξη που μου προσέφερε όλα αυτά τα αξέχαστα χρόνια που συμμετείχα στην ερευνητική του ομάδα. Πιστεύω ότι είναι ο σημαντικότερος δάσκαλος που είχα μέχρι στιγμής. Ελπίζω να φανώ αντάξιος όχι μόνο της διδασκαλίας του αλλά και της φιλίας του.

Θέλω να ευχαριστήσω επίσης τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τον Σήφη Παπαμαθθαίακη και Γιώργο Χαλεπάκη για τις πολύ χρήσιμες συμβουλές και ιδέες τους κατά την επίβλεψη της διδακτορικής μου διατριβής. Επίσης ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της εφταμελούς εξεταστικής μου επιτροπής Χρήστο Λούη, Χαράλαμπο Σαββάκη, Δημήτρη Τζαμαρία και Δόμνα Καραγωγέως για τις παρατηρήσεις τους και τις διορθώσεις τους. Επιπλέον, τους ευχαριστώ όλους για την προθυμία τους να αναταποκριθούν στις ημερομηνίες που είχα προτείνει σε μία ιδιαίτερα πιεστική περίοδο.

Θέλω να ευχαριστήσω τον Γιάννη Ταλιανίδη για τις λύσεις που μου έδινε σε προβλήματα που είχαν παρουσιαστεί κατά καιρούς και για την ευγενική προσφορά του σε πλασμίδια που αποδείχθηκαν πολύ χρήσιμα, και τους Τάσο Οικονόμου και Λίλυ Καραμάνου για την στήριξη σε προσωπικό πλέον επίπεδο με ενθαρρυντικά πάντα σχόλια και συμβουλές, από την πρώτη στιγμή που έφτασα στο Ηράκλειο.

Πραγματικά δε βρίσκω λόγια να ευχαριστήσω τον αδερφικό μου φίλο Γιώργο Σιανίδη. Ο Γιώργος μου στάθηκε άπειρες φορές. Η κατανόηση και οι συμβουλές του ήταν σαν να προέρχονται από τον μεγαλύτερό μου αδερφό. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Χριστίνα Μπαριτάκη. Η προσωπικότητά της, η «τρέλα» της, η αγάπη της άνοιξαν νέους ορίζοντες και αποτελούν πάντα πηγή δύναμης και ενέργειας και κίνητρο να προσπαθώ να γίνομαι καλύτερος.

Ευχαριστώ τους Μιχάλη Αβέρωφ και Maura Strigini. Η βοήθεια τους είναι ανεκτίμητη. Ο Μιχάλης μου έδωσε να καταλάβω την αξία των επιλογών μου με όλες τις συζητήσεις που είχαμε κατά καιρούς και με βοήθησε σημαντικά να βρω το δρόμο μου. Η Maura αποτελούσε πάντα παράδειγμα συνδελφικής συμπεριφοράς και τα σχόλιά της ήταν αξέχαστα. Είμαι και στους δύο βαθύτατα ευγνώμων για τη φιλία τους.

Ευχαριστώ ειλικρινά όλα τα παιδιά (τον Βασίλη Μπαούση, που με το μοναδικό του χιούμορ και τη θαυμαστή δεξιότητά του στην κιθάρα μας βοηθούσε να έχουμε φοβερό κέφι, την - κάποτε - μαθήτριά μου Ιωάννα Ζαρίφη, η οποία με βοήθησε πολύ ιδιαίτερα όταν έλειπα στο στρατό, τις Μαριάνθη Κηπαράκη, Tjiana Korf, Θεοδώρα Σαριδάκη, στις οποίες εύχομαι το

καλύτερο) στο εργαστήριο του Χρήστου και του Μιχάλη. Ήταν πάντα πρόθυμοι να με στηρίξουν και να με βοηθήσουν. Θα ήταν μεγάλη παράλειψη να μην αναφέρω τον Κώστα Μπούλια, ο οποίος έκανε πολλή και σημαντική δουλειά κατά την παραμονή του στο εργαστήριο Δελιδάκη. Τον ευχαριστώ ακόμα και για όσα δίδαξε αυτός σε μένα.

Ιδιαίτερα όμως θέλω να ευχαριστήσω τα παρακάτω άτομα, με τα οποία είναι τιμή και χαρά μου που συνδέθηκα και με δεσμούς φιλίας όλα αυτά τα χρόνια. Θα 'θελα λοιπόν να αναφερθώ πρώτα στον Γιώργο Απιδιανάκη, ο οποίος ήταν κυριολεκτικά ο πρώτος που συνάντησα στο εργαστήριο του Χρήστου. Οι συμβουλές του και οι συζητήσεις μαζί του έκαναν τη δουλειά πιο εύκολη και πιο ευχάριστη. Η Χρυσούλα Πιτσούλη προσέθετε πάντα μία μοναδική νότα στο ανδροκρατούμενο αρχικά εργαστήριο. Είχε πάντα την απεριόριστη προθυμία και την ανεξάντλητη υπομονή να ακούσει κάθε είδους πρόβλημα και να βοηθήσει εμπράκτως σε όλες τις δύσκολες φάσεις μέσα και έξω από το εργαστήριο. Με τον Κωστή Κουμπανάκη ανταλάσσαμε συνεχώς απόψεις και ιδέες και συνεργαστήκαμε άφογα όλο αυτόν τον καιρό που δουλεύαμε μαζί δίπλα-δίπλα. Η κριτική του ήταν πάντα καλόπιστη και εποικοδομητική και το κουράγιο του μου έδινε πολλές φορές δύναμη να συνεχίσω ακόμα και όταν η κούραση μας είχε πλέον εξαντλήσει. Ο Τάσος Παυλόπουλος ήταν πάντα πρόθυμος να βοηθήσει, από τεχνικά ως θεωρητικά ζητήματα. Η αποφασιστικότητά του και η επιμονή του αποτέλεσαν παράδειγμα για μένα. Χαίρομαι που όλοι τους ήταν και μέρος της ζωής μου πέρα από το εργαστήριο και εύχομαι οι αποστάσεις να μη φθείρουν τις σχέσεις μας.

Ευχαριστώ με όλη μου την καρδιά την Κατερίνα και τη Στέλλα. Η βοήθειά τους ήταν πάντα δεδομένη. Πρέπει όμως να διευκρινίσω ότι η βοήθεια που μας προσέφεραν δεν προέκυπτε από απλή επαγγελματική υποχρέωση, αλλά από γνήσιο ενδιαφέρον και αγάπη. Πραγματικά τις ευχαριστώ για όλη την υποστήριξη.

Αν δεν ήταν ο Γιάννης Λειβαδάρας, η Πόπη (η οποία πάντα με προμήθευε με τα απαραίτητα υλικά ακόμα και όταν εγώ ξεχνούσα να τα ζητήσω) και ο Γιώργος ο Βρέντζος ένα μεγάλο μέρος αυτής της δουλειάς θα ήταν ανέφικτο να γίνει.

Ευχαριστίες πολλές στον οδοντίατρο Χρήστο Δημηρόπουλο, ένα από τα φιλαράκια από το στρατό. Υπηρετήσαμε μαζί στο Διδυμότειχο και στη Βέροια. Καθώς ένα μεγάλο μέρος της διατριβής γράφτηκε κυριολεκτικά μέσα στο στρατόπεδο της Βέροιας, η κατανόηση και η στήριξη του ήταν ουσιαστική. Του εύχομαι καλή σταδιοδρομία στο εξωτερικό και ελπίζω να ξαναβρεθούμε σύντομα. Με την ευκαιρία αυτή στέλνω ευγενικούς και εγκάρδιους χαιρετισμούς σε όλους τους «μάχιμους» φίλους (Κώστα Βιρβίλη, Μπάμπη Βλαχάτη, Γιώργο Λάιο, Θανάση

Λαμπρούλη, Άκη Σακκά), των οποίων η φιλία, υπομονή και απίστευτη παρέα έκανε μία δύσκολη περίοδο να αποτελεί τώρα μία ευχάριστη ανάμνηση.

Το πιο σημαντικό ευχαριστώ θα ήθελα να πω στους γονείς μου Γιάννη και Ζωή για την ψυχολογική, ηθική και υλική υποστήριξη που μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια. Όταν τους ανακοίνωσα ότι ήθελα να συνεχίσω σε μεταπτυχιακό επίπεδο τις σπουδές μου, με υποστήριξαν αναντίρρητα και ουσιαστικά. Προσπαθούσαν πάντα να κατανοήσουν τα προβλήματα που αντιμετώπιζα όλα αυτά τα χρόνια και με καθησύχαζαν δίνοντάς μου σοφές συμβουλές. Στην ουσία, χωρίς αυτούς δε θα μπορούσα να εκπληρώσω το στόχο που είχα θέσει, γι' αυτό και σε αυτούς οφείλω ότι έχω αποκτήσει μέχρι σήμερα. Για ακόμη μία φορά, καθώς -όπως νοιώθω- ένας ακόμη κύκλος τελειώνει και νέες περιπέτειες μας περιμένουν, καταλαβαίνω πόσο τυχερός είμαι που τους είχα δίπλα μου. Το πιο μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω σε αυτούς!

Περίληψη

A) Η έναρξη της νευρογένεσης βασίζεται στην ενεργότητα ενός συνόλου bHLH μεταγραφικών παραγόντων, των προνευρικών πρωτεϊνών [όπως οι πρωτεΐνες Achaete (Ac) και Scute (Sc) στη *Drosophila melanogaster*], των οποίων η έκφραση προσδίδει σε εκτοδερμικές περιοχές τη δυνατότητα να ακολουθήσουν νευρική αναπτυξιακή πορεία. Η τελική δρομολόγηση προς την ταυτότητα του νευρικού προδρόμου κυττάρου εξαρτάται από τη λειτουργική σχέση μεταξύ των προνευρικών ενεργοποιητών με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων οι, ανταγωνιστικές, HES [E(spl)] πρωτεΐνες. Οι E(spl)m7 και my είναι ισχυροί καταστολείς της νευρικής τύχης ακόμα και όταν υπάρχει περίσσεια ενεργής Sc και ακόμα και όταν η πρόσδεσή τους σε αλληλουχίες DNA έχει απενεργοποιηθεί. Επίσης, είναι ικανές να καταστείλουν γονίδια στόχους μέσω πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης με τις προνευρικές πρωτεΐνες ήδη προσδεμένες σε αντίστοιχες αλληλουχίες σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων αυτών. Για τη κατασταλτική τους δράση είναι πάντα απαραίτητο να αλληλεπιδρούν με το συγκαταστολέα Groucho. Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι η αμινοτελική περιοχή της E(spl)m7, συμπεριλαμβανομένου της bHLH περιοχής, και η καρβοξυτελική περιοχή της Sc αλληλεπιδρούν *in vivo* και *in vitro*. Η καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης Sc ενεργοποιεί τη μεταγραφή και είναι υπεύθυνη για την στρατολόγηση της E(spl)m7. *In vivo* είναι επίσης υπεύθυνη για τη στρατολόγηση της E(spl)m7 κατά τρόπο εξαρτώμενο από τον ενισχυτή στο οποίο αυτή προσελκύεται, καθώς σε πιο σύνθετους ενισχυτές πρόσθετοι μεταγραφικοί παράγοντες παρέχουν εναλλακτικές επιφάνειες πρόσδεσης και αλληλεπίδρασης. Από την άλλη μεριά η ακεριότητα της περιοχής Orange είναι απαραίτητη για την ενεργότητα της E(spl) *in vivo*.

Ανάλυση γονιδίων ανταποκριτών και του προτύπου έκφρασης των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων στο θώρακα ενήλικων ατόμων δείχνει ότι υπάρχουν δύο τρόποι δράσης των E(spl) πρωτεϊνών *in vivo*: α) άμεση πρόσδεση στο DNA και β) έμμεση πρόσδεση στους ενισχυτές μέσω προνευρικών πρωτεϊνών.

B) Οι E(spl) πρωτεΐνες ανήκουν στην οικογένεια των bHLH-Orange πρωτεϊνών. Βασικό χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών αυτών είναι η περιοχή Orange, η οποία παίζει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο ενδο- και διαμορικών αλληλεπιδράσεων και κατ' επέκταση ίσως της ενεργότητάς τους. Υπάρχουν 13 αντιπρόσωποι αυτής της οικογένειας στη *Drosophila melanogaster*. Μεταξύ αυτών είναι η πρωτεΐνη Hey, η οποία ανήκει σε ένα διακριτό σύνολο με εξελικτικά συντηρημένα δομικά χαρακτηριστικά. Τα ομόλογα γονίδια Hey των σπονδυλωτών έχουν εξεταστεί εκτεταμένα. Φαίνεται να παίζουν ιδιαίτερο ρόλο σε πληθώρα αναπτυξιακών διαδικασιών όπως η νευρογένεση και η αγγειογένεση. Επίσης, φαίνεται να είναι άμεσοι μεταγραφικοί στόχοι του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch. Οι Hey πρωτεΐνες σχηματίζουν ετεροδιμερή με τις Hes πρωτεΐνες, με τις οποίες συνεργάζονται για την αποτελεσματικότερη μεταγραφική καταστολή γονιδίων στόχων. Επειδή τίποτα δεν είναι γνωστό για την πρωτεΐνη Hey της *Drosophila melanogaster*, εξετάστηκε το πρότυπο έκφρασης της και η σχέση της με το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι εκφράζεται σε υποσύνολο νευρώνων του ΚΝΣ και ΠΝΣ στο έμβρυο, την προνύμφη και τη νύμφη και ότι η έκφρασή της παραμένει ακόμα και όταν η σηματοδότηση Notch έχει σημαντικά μειωθεί. Επομένως, δε φαίνεται να είναι στόχος του Notch (υπό τις παρούσες πειραματικές συνθήκες).

Abstract

A) Neurogenesis in all animals is triggered by the activity of a group of bHLH transcription factors, the proneural proteins [i.e. Achaete (Ac) and Scute (Sc)], whose expression endows ectodermal regions with neural potential. The eventual commitment to a neural precursor fate involves the interplay of these proneural transcriptional activators with a number of other transcription factors, which fine-tune transcriptional responses at target genes. Most prominent among the factors antagonizing proneural protein activity are the HES [E(spl)] bHLH proteins. We show here that E(spl) proteins m7 and my are potent inhibitors of neural fate, even in the presence of excess Sc activity and even when their DNA-binding basic domain has been inactivated. Furthermore, these E(spl) proteins can efficiently repress target genes that lack cognate DNA binding sites, as long as these genes are bound by Ac/Sc activators. This activity of E(spl)m7 and mg correlates with their ability to interact with proneural activators, through which they are probably tethered on target enhancers. The co-repressor Groucho is always needed for target gene regulation. In addition, by using *in vivo* and *in vitro* assays we have discovered that the N-terminal region (including the bHLH domain) of E(spl)m7 interacts with the C-terminal domain of Sc. An important dual role for the Sc C-terminal domain is shown: on one hand it acts as a transcription activation domain and on the other it is used to recruit E(spl) proteins. *In vivo*, the Sc C-terminal domain is required for E(spl) recruitment in an enhancer-context dependent fashion, suggesting that in some enhancers alternative interaction surfaces can be used to recruit E(spl) proteins. As far as E(spl)m7 is concerned, the integrity of the Orange domain is important for its activity.

Analysis of reporter genes and sensory organ (bristle) patterns reveals that, in addition to this indirect recruitment of E(spl) onto enhancers via protein-protein interaction with bound Ac/Sc factors, direct DNA binding of target genes by E(spl) also takes place.

B) E(spl) proteins belong to a family of bHLH proteins, called bHLH-Orange proteins. All members of this family share homology with respect to a region called the Orange domain, which is considered to play an important role in the regulation of the proteins' intra- and intermolecular interactions and possibly thereby of their activity. Computational analysis of the *Drosophila* genome has shown that there are 13 representative members of this family. We were particularly interested in Hey protein. Hey protein belongs to a subgroup of bHLH-Orange proteins with distinct, evolutionarily conserved structural characteristics. Hey genes have been studied extensively in vertebrates and they have been shown to participate in numerous developmental processes such as angiogenesis and neurogenesis. They have also been shown to be novel targets of Notch signalling. Hey proteins are heterodimeric partners of Hes proteins, with which they co-operate to achieve a more efficient transcriptional repression of target genes. However, nothing is known about the corresponding gene in *Drosophila*. We have studied its expression pattern in various tissues and developmental stages. It has been revealed that it is always expressed in a subset of postmitotic neurons. Its expression pattern persists even after Notch signalling is seriously reduced, suggesting (at least under the present experimental conditions) that it is possibly not a target of the Notch pathway.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ (ΜΕΡΟΣ Α)

1.1 Νευρογένεση στη *Drosophila melanogaster*.

Ένα από τα βασικότερα ερωτήματα για την επιστήμη της νευροβιολογίας είναι πως δημιουργείται η κυτταρική ποικιλότητα στο νευρικό σύστημα του οργανισμού. Στα ασπόνδυλα, νευρικά πρόδρομα κύτταρα ακολουθούν ένα συγκεκριμένο πρότυπο μιτωτικών διαιρέσεων για τη δημιουργία ενός πολύπλοκου δικτύου νευρώνων και σχετιζόμενων με αυτούς κυττάρων. Στη *Drosophila* τα νευρικά πρόδρομα κύτταρα είναι οι νευροβλάστες του κεντρικού νευρικού συστήματος και τα πρόδρομα κύτταρα αισθητηρίων οργάνων του περιφερικού νευρικού συστήματος.

Στα επόμενα κεφάλαια θα δοθεί αρχικά μια συνοπτική περιγραφή ορισμένων βασικών απόψεων της ανάπτυξης του νευρικού συστήματος στη *Drosophila*. Στη συνέχεια θα εισαχθεί η έννοια της πλευρικής αναστολής, του μηχανισμού επιλογής του νευρικού πρόδρομου κυττάρου από ομάδα ισοδύναμων αναπτυξιακά κυττάρων, που ισχύει τόσο κατά την πρώιμη νευρογένεση όσο και κατά την ανάπτυξη του περιφερικού νευρικού συστήματος του ενήλικου ατόμου. Ο μηχανισμός της πλευρικής αναστολής και τα γονίδια που παίζουν βασικό ρόλο στην διεκπεραίωσή του θα περιγραφούν αναλυτικά στην περίπτωση της επιλογής του πρόδρομου κυττάρου των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού.

1.2 Το εμβρυϊκό κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) της *Drosophila melanogaster*. Χαρακτηριστικά των νευροβλαστών.

Στα έντομα οι νευρώνες δημιουργούνται από τον πολλαπλασιασμό κυττάρων, των νευροβλαστών. Οι νευροβλάστες του ΚΝΣ είναι βλαστικά κύτταρα, διότι είναι ικανά να διαιρούνται σε ένα νέο νευροβλάστη (neuroblast-NB), αναγεννώντας με αυτόν τον τρόπο τον εαυτό τους και ένα ακόμη κύτταρο, με πιο περιορισμένο αναπτυξιακό δυναμικό, το γαγγλιακό μητρικό κύτταρο (ganglion mother cell-GMC). Τα GMC κύτταρα είναι ενδιάμεσα πρόδρομα κύτταρα που διαιρούνται μία φορά για να αποδώσουν τους μεταμιτωτικούς νευρώνες ή, όπως παρατηρείται στην περίπτωση ορισμένων κυτταρικών γενεαλογιών, νευρώνες και γλοία. Καθώς τα απόγονα κύτταρα των νευροβλαστών έχουν διαφορετική αναπτυξιακή τύχη, ο τρόπος διαίρεσης του νευροβλάστη είναι ασύμμετρος. Ο ασύμμετρος τρόπος διαίρεσης των νευροβλαστών βασίζεται στην ασύμμετρη κατανομή εγγενών παραγόντων στα θυγατρικά κύτταρα ή/και στη διαφορετική επίδραση εξωγενών παραγόντων επί των δύο απογόνων κυττάρων του. Η ασυμμετρία εκδηλώνεται και σε μορφολογικό επίπεδο. Οι νευροβλάστες διακρίνονται από το μεγάλο τους μέγεθος (διάμετρο 8-12μm), σχετικά μικρό λόγο πυρήνα/κυτταροπλάσματος,

κορυφαία θέση σε σχέση με τα γαγγλιακά μητρικά κύτταρα και υψηλή πολλαπλασιαστική ικανότητα. Από την άλλη τα γαγγλιακά μητρικά κύτταρα κατέχουν θέση πιο βασική σε σχέση με το νευροβλάστη, είναι μικρού μεγέθους (διάμετρο 3-5 μm) με περιορισμένη πολλαπλασιαστική ικανότητα (Campos-Ortega 1993, Goodman and Doe 1993, Hartenstein and Campos-Ortega 1984).

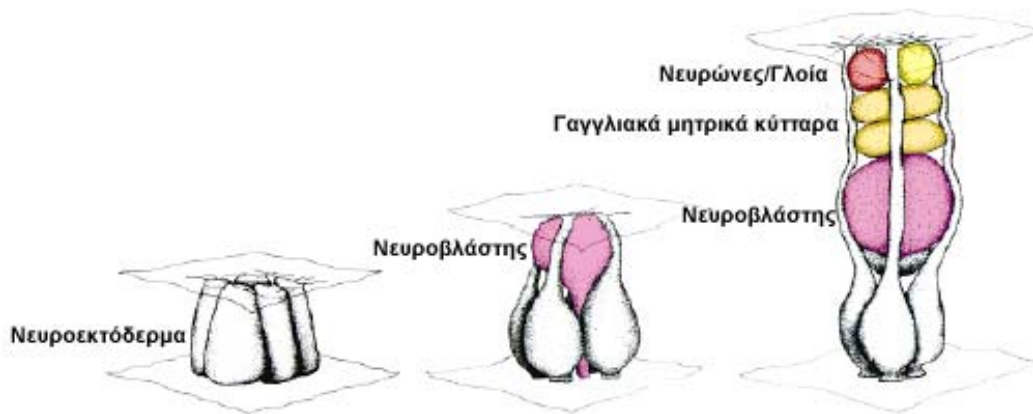
Οι νευροβλάστες αναπτύσσονται σε μία ειδική νευρογόνο περιοχή, το νευροεκτόδερμα. Τα κύτταρα του νευροεκτοδέρματος της *Drosophila melanogaster* "επιλέγουν" να αναπτυχθούν είτε προς νευροβλάστες είτε προς κύτταρα της επιδερμίδας. Κάθε κύτταρο έχει την ίδια πιθανότητα να ακολουθήσει τη μία ή την άλλη αναπτυξιακή πορεία. Σε τελική ανάλυση ωστόσο, μόνο το ένα τέταρτο του συνολικού αριθμού των κυττάρων του νευροεκτοδέρματος, θα αναπτυχθεί προς νευροβλάστες. Η (φαινομενική) απλότητα της αναπτυξιακής αυτής διαδικασίας, όπου τα κύτταρα καλούνται να επιλέξουν μεταξύ δύο αναπτυξιακών πιθανοτήτων, έχει καταστήσει τη πρώιμη ανάπτυξη του νευρικού συστήματος ως ένα από τα καταλληλότερα συστήματα για τη μελέτη των μηχανισμών που διέπουν την κυτταρική διαφοροποίηση σε ένα πολυκύτταρο οργανισμό (Campos-Ortega 1993, Goodman and Doe 1993, Hartenstein and Campos-Ortega 1984).

Πρέπει να σημειωθεί ότι η πρώιμη νευρογένεση συμπεριλαμβάνει και άλλες, εξίσου ενδιαφέρουσες διαδικασίες, όπως για παράδειγμα τον καθορισμό μιας συγκεκριμένης περιοχής ως νευροεκτόδερμα, το διαχωρισμό της σε κοιλιακό νευροεκτόδερμα, από το οποίο θα προκύψουν η νευρική χορδή και το υποοισοφαγικό γάγγλιο, και προκεφαλικό νευροεκτόδερμα, απ' όπου θα προκύψουν τα εγκεφαλικά ημισφαίρια, και τέλος, την εξειδίκευση συγκεκριμένων τύπων νευροβλαστών σε πρόδρομα κύτταρα για συγκεκριμένες νευρικές γενεαλογίες. Ωστόσο το μόνο σημείο εστίασης στη συνέχεια θα είναι η περιγραφή και η ερμηνεία της διαδικασίας διαχωρισμού νευροβλαστών από επιδερμοβλάστες στο νευροεκτόδερμα.

Το νευροεκτόδερμα είναι μορφολογικά διακριτό κατά την αρχική φάση του σταδίου 8 της εμβρυογένεσης, οπότε και παρατηρείται η επιμήκυνση της βλαστικής ζώνης, αμέσως πριν την έναρξη της μιτωτικής δραστηριότητας στην εκτοδερμική στοιβάδα. Η περιοχή του εκτοδέρματος χωρίζεται σε μία πλευρική περιοχή, αποτελούμενη από μικρά κυλινδρικά κύτταρα, που θα δώσει την ραχιαία επιδερμίδα και μία μέση περιοχή, το νευροεκτόδερμα, που αποτελείται από μεγάλα κυβοειδή κύτταρα και θα δώσει τη νευρική χορδή και τη κοιλιακή επιδερμίδα (Campos-Ortega 1993, Goodman and Doe 1993, Hartenstein and Campos-Ortega 1984).

Ο διαχωρισμός των νευροβλαστών είναι πολύ δυναμική διεργασία, διαρκεί περίπου τρεις ώρες, είναι ασυνεχής, πραγματοποιείται δηλαδή σε πέντε διαφορετικά κύματα SI-SV, και

συνοδεύεται από μορφολογικές αλλαγές των κυττάρων του νευροεκτοδέρματος. Αρχικά, όλα τα κύτταρα του νευροεκτοδέρματος μεγεθύνονται, γεγονός που σύμφωνα με τους Hartenstein and Campos-Ortega (1984) μπορεί να αντιπροσωπεύει την απόκτηση του νευρικού δυναμικού εξίσου απ' όλα τα κύτταρα του νευροεκτοδέρματος. Οι νευροβλάστες διαχωριζόμενοι από το νευροεκτόδεσμα, μετακινούνται από την εξωτερική επιφάνεια προς το εσωτερικό του εμβρύου για να εγκατασταθούν μεταξύ μεσοδέρματος και εκτοδέρματος, όπου θα αρχίσει η συγκρότηση του ΚΝΣ. Τα νευροεκτοδερμικά κύτταρα δίπλα στους μεταναστεύοντες νευροβλάστες διατηρούν στενή επαφή με αυτούς μέσω μακριών βασικών προεκτάσεων, που παροδικά περιβάλλουν το νευροβλάστη σχηματίζοντας ένα είδος καλύπτρας. Οι επαφές αυτές είναι υπεύθυνες για τη διακυτταρική επικοινωνία. Αμέσως μετά το διαχωρισμό τους από το νευροεκτόδεσμα οι νευροβλάστες αρχίζουν να διαιρούνται με ασύμμετρο τρόπο. Κάθε διαίρεση αποδίδει δύο θυγατρικά κύτταρα, το γαγγλιακό μητρικό κύτταρο και ένα νέο νευροβλάστη, ο οποίος πάλι θα διαιρεθεί ασύμμετρα αργότερα. Τα κύτταρα του νευροεκτοδέρματος που παραμένουν ως επιδερμοβλάστες στο εξωτερικό μέρος του εμβρύου αποσύρουν τις προεξοχές μέσω των οποίων έρχονταν σε επαφή με το νευροβλάστη και μικραίνουν σε μέγεθος, αρκετά αργότερα μετά το διαχωρισμό και την εγκόλπωση των νευροβλαστών προς το εσωτερικό το εμβρύου (Campos-Ortega 1993, Goodman and Doe 1993, Hartenstein and Campos-Ortega 1984, Doe et al 1998) (Εικ. 1).



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της επιλογής και του διαχωρισμού ενός νευροβλάστη του ΚΝΣ από τα γειτονικά του κύτταρα και των θυγατρικών κυττάρων του. Οι κυτταρικές επαφές διατηρούνται και εξυπηρετούν για τη διεκπεραίωση της κυτταρικής επικοινωνίας. (από Doe et al 1998).

Η απόφαση των κυττάρων του νευροεκτοδέρματος σχετικά με την αναπτυξιακή τους πορεία ρυθμίζεται από διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις. Αποδείξεις για το γεγονός αυτό αποτελούν πρωταρχικώς πειράματα ομοτοπικών, ετεροτοπικών, ετεροχρονικών και διαειδικών μεταμοσχεύσεων κυττάρων και πειράματα καταστροφής κυττάρων-νευροβλαστών με ακτίνες laser στις ακρίδες. Τα βασικά συμπεράσματα που προκύπτουν είναι ότι όλα τα κύτταρα του νευροεκτοδέρματος αποκτούν το νευρικό αναπτυξιακό δυναμικό στο συγκεκριμένο μικροπεριβάλλον και ότι οι μελλοντικοί νευροβλάστες καταστέλλουν τα γειτονικά τους κύτταρα από το να υιοθετήσουν την ίδια αναπτυξιακή πορεία, οι δε σηματοδοτικοί μηχανισμοί της νευρογένεσης είναι εξελικτικά συντηρημένοι. Επιπλέον, φαινότυποι μεταλλαγών γονιδίων που επηρεάζουν τη διαδικασία αυτή επιβεβαιώνουν και διαφωτίζουν τη λειτουργία των ρυθμιστικών για την νευρογένεση μηχανισμών διακυτταρικής επικοινωνίας (Campos-Ortega 1993, Goodman and Doe 1993, Hartenstein and Campos-Ortega 1984).

1.3 Το περιφερικό νευρικό σύστημα (ΠΝΣ) της *Drosophila melanogaster*.

Το ΠΝΣ της *Drosophila melanogaster* αποτελείται από αισθητήρια και κινητικά τμήματα. Οι δενδρίτες και τα κυτταρικά σώματα των αισθητηρίων νευρώνων βρίσκονται στην περιφέρεια και οι άξονές τους προεκτείνονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Τα κυτταρικά σώματα των κινητήριων νευρώνων βρίσκονται μέσα στο ΚΝΣ και οι άξονές τους εκτείνονται περιφερειακά προς τους μύες. Η *Drosophila melanogaster* είναι ολομετάβολο έντομο και γι' αυτό έχει και προνυμφικό και ενήλικο ΠΝΣ. Το προνυμφικό ΠΝΣ σχηματίζεται κατά την εμβρυογένεση και η πλειονότητα των νευρώνων εκφυλίζεται κατά τη διάρκεια του σταδίου της νύμφης. Οι αισθητήριοι νευρώνες του ενήλικου ατόμου σχηματίζονται εκ νέου κατά τη διάρκεια του τρίτου προνυμφικού σταδίου και του σταδίου της νύμφης. Λίγα είναι γνωστά για τους την αναπτυξιακή τύχη των προνυμφικών κινητηρίων νευρώνων. Φαίνεται ότι τουλάχιστον ορισμένοι αποσύρουν τους άξονές τους όταν οι μύες της προνύμφης εκφυλίζονται κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων της νύμφης. Οι ίδιοι νευρώνες εκτείνουν τους άξονές τους σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια για τη νεύρωση ενός υποσυνόλου μυών του ενήλικου ατόμου (Jan and Jan 1993).

Τα αισθητήρια όργανα της *Drosophila melanogaster* ποικίλλουν σε σχήμα και μορφή. Οι αισθητήριοι νευρώνες κατηγοριοποιούνται σε δύο κύριες κατηγορίες: τους νευρώνες τύπου I, οι οποίοι φέρουν μονούς δενδρίτες και τους νευρώνες τύπου II με πολλαπλούς δενδρίτες. Επίσης, μπορούν να ομαδοποιηθούν σε εξωτερικά αισθητήρια όργανα, τα οποία αποτελούνται από εξωτερικές και εσωτερικές δομές, και τα εσωτερικά αισθητήρια όργανα, τα οποία αποτελούνται αποκλειστικά από εσωτερικές δομές (Jan and Jan 1993).

Στο ενήλικο άτομο *Drosophila melanogaster* τα αισθητήρια όργανα έχουν παρόμοια βασική δομή με τα αισθητήρια όργανα της προνύμφης, αν και παρουσιάζουν μεγαλύτερη ποικιλία στο σχήμα και ενδεχομένως και στη λειτουργία. Τρία είδη αισθητηρίων οργάνων υπάρχουν:

- Εξωτερικά αισθητήρια όργανα: φέρουν εξωτερικές δομές για την ανίχνευση μηχανικών ή χημικών ερεθισμάτων. Τυπικά, τα εξωτερικά αισθητήρια όργανα αποτελούνται από τέσσερα τμήματα. Δύο από αυτά είναι εκτεθειμένα στο εξωτερικό περιβάλλον: η αισθητήρια δομή, που σχηματίζεται από το τριχογόνο κύτταρο και η θήκη, που σχηματίζεται από το τορμογόνο κύτταρο. Η αισθητήρια δομή μπορεί να έχει διάφορες μορφές, όπως για παράδειγμα σμήριγγες με οξύ άκρο ή με ανοιχτό άκρο στα μηχανοαισθητήρια ή στα χημειοαισθητήρια όργανα αντιστοίχως ή ακόμα και θολωτές δομές στα καμπανιφόρμια αισθητήρια. Τα άλλα δύο τμήματα των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων είναι εσωτερικά και αποτελούνται από ένα ή περισσότερους νευρώνες, ο καθένας με ένα μόνο δενδρίτη (τύπος I) συνδεδεμένος με την εξωτερική αισθητήρια δομή και έναν άξονα που προβάλλει στο ΚΝΣ, και το θηκογόνο κύτταρο επικουρικού χαρακτήρα που καλύπτει μέρος του/ των νευρώνα/ νευρώνων. Ο θώρακας και το φτερό της *Drosophila melanogaster* περιέχουν πολλούς τύπους εξωτερικών μηχανοαισθητηρίων οργάνων, για παράδειγμα τις μικροχαίτες και τις μακροχαίτες στο θώρακα και στην εγγύς περιοχή του φτερού, τις εύρωστες (stout) και τις λεπτές (slender) σμήριγγες του περιθωρίου του φτερού και τα καμπανιφόρμια αισθητήρια στις φλέβες και στην ακτίνα (κερκίδα, radius) του φτερού. Υπάρχει μόνο ένας τύπος εξωτερικού χημειοαισθητηρίου οργάνου εκπροσωπούμενος από τις αναδιπλούμενες σμήριγγες (recurved) του προσθίου περιθωρίου του φτερού και τα αισθητήρια τριχοειδή του εγγύς περιθωρίου του φτερού.
- Χορδοτονικά όργανα: αποκλειστικά εσωτερικά τοποθετημένα αισθητήρια όργανα, υπεύθυνα για την αντίληψη του προσανατολισμού. Βρίσκονται κοντά στο τοίχωμα του σώματος και στις αρθρώσεις, είτε μόνα τους είτε σαν δέσμες κυττάρων. Μεγάλος αριθμός χορδοτονικών οργάνων βρίσκεται επίσης στο όργανο του Johnston, μία περίπλοκη δομή στην κεραία του ενήλικου ατόμου, όπου πιθανώς λειτουργούν ως αισθητήρες ακοής. Τα χορδοτονικά όργανα έχουν σωληνοειδές σχήμα και αποτελούνται από ένα τύπου I νευρώνα και τρία επικουρικού χαρακτήρα κύτταρα: το συνδεσμικό (ligament) κύτταρο, το θηκογόνο (sheath) κύτταρο και το θύλακα (cap). Είναι όμοια με τα εξωτερικά αισθητήρια όργανα στο ότι και τα δύο φέρουν τύπου I νευρώνες. Φαίνεται μάλιστα ότι υπάρχουν διδύναμα πρόδρομα αισθητήρια κύτταρα, που αναπτύσσονται προς εξωτερικά ή

χορδοτονικά αισθητήρια όργανα κατεύθυνση ανάλογα με το αν εκφράζεται το γονίδιο *cut* ή όχι αντιστοίχως.

- Πολυδενδρικοί νευρώνες: εσωτερικά τοποθετημένοι αισθητήριοι νευρώνες που λειτουργούν ως αισθητήρες αφής ή προσανατολισμού. Είναι τύπου II νευρώνες καθ' ότι φέρουν πολλαπλούς δενδρίτες. Η πλειονότητα των πολυδενδρικών νευρώνων δε σχετίζεται με επικουρικά κύτταρα στήριξης. Ένα παράδειγμα είναι οι επονομαζόμενοι επιπρόσθετοι νευρώνες (E νευρώνες) στο φτερό.

Κατά την ανάπτυξη του ΠΝΣ κάθε εξωτερικό αισθητήριο όργανο προκύπτει από ένα μοναδικό κύτταρο επονομαζόμενο Πρόδρομο Αισθητήριο Όργανο (ΠΑΟ ή SOP από sensory organ precursor) ή αισθητήριο μητρικό κύτταρο. Οι δύο παραπάνω όροι θεωρούνται ισοδύναμοι αλλά θα προτιμηθεί ο πρώτος όρος. Κάθε SOP επιλέγεται, όπως και στην περίπτωση των νευροβλαστών, από ομάδα κυττάρων, αρχικά ισοδύναμων από αναπτυξιακής απόψεως, δηλαδή ισοδύναμα ικανών να ακολουθήσουν την ίδια αναπτυξιακή πορεία, στην περίπτωση αυτή προς νευρικά κύτταρα. Κάθε SOP, μετά την επιλογή του, θα αναπτυχθεί με διαδοχικές μιτώσεις προς ένα μοναδικό εξωτερικό μηχανοαισθητήριο όργανο και επομένως, όλα τα κύτταρα που το απαρτίζουν συνδέονται οντογενετικά. Τα διάφορα SOP, που όπως και τα εξωτερικά μηχανοαισθητήρια όργανα, εμφανίζονται πάντα στις ίδιες διάσπαρτες θέσεις στους αναπτυξιακούς δίσκους, δε συνδέονται οντογενετικά μεταξύ τους και συνεπώς το πρότυπο του ΠΝΣ ουσιαστικά καθορίζεται από τον χωροχρονικό πρότυπο γένεσης των SOP (Huang 1991).

1.4 Γενετική βάση της νευρογένεσης.

Ο μηχανισμός που έχει προταθεί για την ανάπτυξη των αισθητηρίων οργάνων φαίνεται να ισχύει και για τη πρόωμη νευρογένεση (Campos-Ortega 1993): Όλα τα κύτταρα μιας ομάδας κυττάρων αποκτούν τη δυνατότητα να ακολουθήσουν την νευρική αναπτυξιακή πορεία προς σχηματισμό νευροβλαστών/πρόδρομων αισθητηρίων οργάνων, χάρη στην έκφραση των προνευρικών γονιδίων. Σε δεύτερο στάδιο, μόνο ένα κύτταρο από κάθε ομάδα απομονώνεται και αναπτύσσεται προς νευροβλάστη/πρόδρομο αισθητήριο όργανο, ο οποίος/το οποίο στη συνέχεια αλληλεπιδρά με τα γειτονικά του κύτταρα, ενεργοποιώντας την έκφραση των νευρογόνων γονιδίων *E(spl)* σε αυτά και παρεμποδίζοντάς τα να ακολουθήσουν την ίδια πορεία. Τα κύτταρα αυτά αναπτύσσονται τελικά προς κύτταρα της επιδερμίδας.

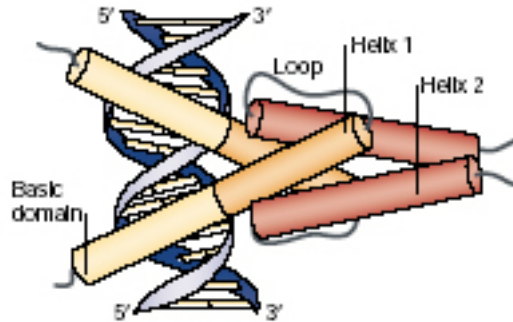
Η ανασταλτική διαδικασία κατά την οποία πραγματοποιείται η επιλογή ενός μοναδικού κυττάρου από ομάδα ισοδύναμων αναπτυξιακά κυττάρων είναι γνωστή ως πλευρική αναστολή και διεκπεραιώνεται από το σηματοδοτικό μονοπάτι του Notch που ρυθμίζει εν τέλει την έκφραση των λειτουργικά αλληλεξαρτώμενων γονιδίων, δηλαδή των προνευρικών που

κωδικοποιούν πρωτεΐνες bHLH που ωθούν προς την νευρική αναπτυξιακή πορεία και των γονιδίων *E(spl)* που κωδικοποιούν πρωτεΐνες bHLH που τις ανταγωνίζονται.

Είναι όμως απαραίτητο να προηγηθεί μια συνοπτική περιγραφή της οικογένειας των πρωτεϊνών HLH, στις οποίες ανήκουν τόσο τα προϊόντα των γονιδίων *E(spl)* όσο και τα προϊόντα των προνευρικών γονιδίων, των οποίων η δράση θα αναλυθεί παρακάτω.

1.5 Συνοπτική περιγραφή και κατηγοριοποίηση των πρωτεϊνών HLH.

Οι πρωτεΐνες HLH αποτελούν μία ευρεία οικογένεια πρωτεϊνών με κρίσιμους ρόλους σε πλειάδα αναπτυξιακών και μεταβολικών διαδικασιών (Massari and Murre 2000). Ειδικότερα, οι πρωτεΐνες bHLH είναι ένα μεγάλο υποσύνολο της παραπάνω οικογένειας, που χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μίας βασικής περιοχής, ικανής να προσδεθεί σε εξανουκλεοτιδικές DNA αλληλουχίες, ακολουθούμενη από μία περιοχή διμερισμού, αποτελούμενη από δύο αμφιπαθικές α-έλικες, διαχωριζόμενες από μία θηλιά (loop) (Εικ.2) (Ledent and Vervoort 2001, Massari and Murre 2000). Οι θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών bHLH είναι της νουκλεοτιδικής σύστασης CANNTG, όπου N οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο, και ονομάζονται E αλληλουχίες (Ephrussi et al 1985). Ο διμερισμός των πρωτεϊνών bHLH είναι δυνατόν να συμβαίνει μεταξύ ίδιων ή και διαφορετικών μελών της οικογένειας (Murre et al.1989) και θεωρείται απαραίτητος για την πρόσδεση των βασικών περιοχών στο DNA (Murre et al.1989, Ohsako et al.1994). Πρόσφατα έχει προταθεί μία ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα άποψη, σύμφωνα με την οποία η δομή των πολύπλοκων δικτύων που οι πρωτεΐνες bHLH σχηματίζουν μέσω των πολλαπλών, πειραματικά εμπειρισταωμένων, αλληλεπιδράσεών τους απεικονίζει ότι βασικοί παράγοντες στη συγκρότησή τους είναι φαινόμενα διαπλασιασμού ενός γονιδίου (single gene duplication events), καθώς και φαινόμενα ανασυγκρότησης λειτουργικών τμημάτων (domain rearrangement events), τουλάχιστον πριν το κομβικό σημείο εξελικτικής διαφοροποίησης (divergence) μεταξύ των αρθροπόδων και χορδοτών (Amoutzias et al 2004). Ο μεγάλος αριθμός των bHLH πρωτεϊνών επιβάλλει την κατηγοριοποίησή τους. Οι ακόλουθες κατηγορίες έχουν σχηματιστεί με βάση το πρότυπο έκφρασής τους, την ικανότητα διμερισμού τους την λειτουργία τους και της ικανότητάς τους πρόσδεσης σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA (Fisher and Caudy 1998, Massari and Murre 2000, Ledent and Vervoort 2001) (Εικ.3):

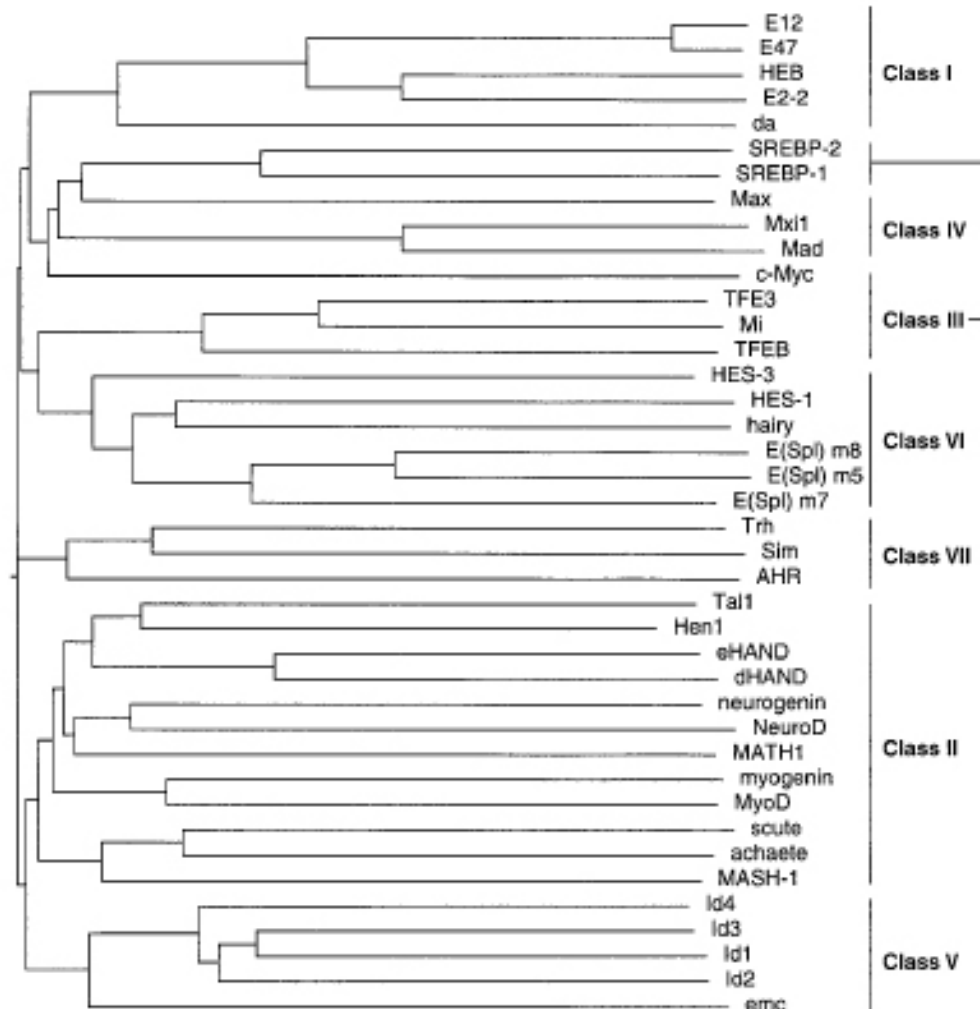


Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση της δομής ενός διμερούς bHLH περιοχών προσδεμένο στο DNA. Η βασική περιοχή (basic domain) προσαρμόζεται στη μεγάλη αύλακα του DNA και πολλά αμινοξέα έρχονται σε άμεση επαφή με την αλληλουχία. Οι δύο α -έλικες από κάθε μονομερές συμπλέκονται για να σχηματίσουν ένα κόμβο από τέσσερις έλικες (από Bertrand et al 2002).

- Η κατηγορία I αποτελείται από τις, επανομαζόμενες, πρωτεΐνες E, με ευρύ πρότυπο έκφρασης και ικανότητα ομο- και ετεροδιμερισμού. Στη *Drosophila* η πρωτεΐνη Daughterless (Da) είναι μοναδικό μέλος της κατηγορίας αυτής.
- Η κατηγορία II αποτελείται από πρωτεΐνες, με συγκεκριμένο ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης και ικανότητα πρόσδεσης στο DNA μόνο ως ετεροδιμερή με τις πρωτεΐνες bHLH της κατηγορίας I. Η πρόσδεσή τους στο DNA συνοδεύεται από μεταγραφική ενεργοποίηση (Cabrera and Alonso 1991, Van Doren et al.1992). Στη *Drosophila* αντιπρόσωποι αυτής της κατηγορίας είναι οι πρωτεΐνες παράγωγα του γονιδιακού συμπλόκου *achaete-scute* (AS-C), για τα οποία θα γίνει εκτενέστερη αναφορά παρακάτω.
- Η κατηγορία III αποτελείται από μέλη της υποοικογένειας Myc, το χαρακτηριστικό των οποίων είναι η περιοχή φερμουάρ λευκίνης σε γειτονία με την HLH περιοχή.
- Η κατηγορία IV συνίσταται από πρωτεΐνες bHLH-ZIP, όπως για παράδειγμα η Mad και Max, οι οποίες μπορούν να ομοδιμερίζονται ή να ετεροδιμερίζονται με τις πρωτεΐνες bHLH της κατηγορίας III.
- Η κατηγορία V αποτελείται από πρωτεΐνες που στερούνται της βασικής περιοχής και είναι για αυτό το λόγο αρνητικοί ρυθμιστές της δραστηριότητας των πρωτεϊνών της κατηγορίας I και II. Η αρνητική ρύθμιση επιτυγχάνεται με τη δημιουργία ετεροδιμερών, ανενεργών ως προς την πρόσδεση σε DNA αλληλουχίες. Στη *Drosophila* μοναδικός εκπρόσωπος της κατηγορίας αυτής είναι η πρωτεΐνη Extramacrochaete (Emc).
- Η κατηγορία VI αποτελείται από μεταγραφικούς παράγοντες bHLH, αρνητικούς ρυθμιστές της μεταγραφής. Χαρακτηριστική σε όλα τα μέλη της οικογένειας είναι η περιοχή Orange,

διατεταγμένη πάντα καρβοξυτελικά σε σχέση με τη βασική περιοχή. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα γονίδια *Enhancer of split [E(spl)]*.

- Τέλος, στην κατηγορία VII ανήκουν πρωτεΐνες bHLH που επίσης φέρουν την περιοχή PAS. Παραδείγματα τέτοιων πρωτεϊνών στη *Drosophila* είναι η πρωτεΐνη Single-minded.



Εικόνα 3: Πολλαπλή στοίχιση των αλληλουχιών (με το πρόγραμμα ClustalW) και κατηγοριοποίηση μερικών από τους πιο αντιπροσωπευτικούς HLH μεταγραφικούς παράγοντες θηλαστικών και *Drosophila* (από Massari and Murre 2000).

Σε ένα διαφορετικό σύστημα κατηγοριοποίησης των HLH πρωτεϊνών ανάλογα με την ειδικότητα της πρόσδεσής τους οι ομάδες που διακρίνονται είναι οι ακόλουθες:

- Η ομάδα A, η οποία συμπεριλαμβάνει τις κατηγορίες I (Daughterless) και II (Achaete, Scute κ.α.). Οι πρωτεΐνες της ομάδας αυτής είναι ικανές να προσδένονται σε θέσεις E του τύπου CAGNTG. Οι θέσεις αυτές ονομάζονται E θέσεις τάξης A.

- Η ομάδα Β αποτελείται από τις πρωτεΐνες των κατηγοριών III, IV και VI. Η κατηγορία αυτή πρωτεϊνών προσδένεται σε Ε αλληλουχίες τύπου CACGTG και CATGTG. Οι αλληλουχίες αυτές ονομάζονται Ε θέσεις τάξης Β. Επιπρόσθετα, οι πρωτεΐνες της κατηγορίας VI [π.χ. E(spl)] προσδένονται σε θέσεις τύπου CACGCG και CACGAG, οι οποίες ονομάζονται Ε θέσεις τάξης C και Ν αλληλουχίες αντίστοιχα (Jennings et al. 1999, Oellers et al., 1994, Ohsako et al 1994, Tietze et al. 1992; Van Doren et al., 1994).
- Η ομάδα Γ και Δ αποτελούνται αντιστοίχως από τις πρωτεΐνες της κατηγορίας VII, που προσδένονται σε αλληλουχίες με κεντρική σύσταση ACGTG ή GCGTG, και V, οι οποίες όπως προαναφέρθηκε δεν έχουν την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA.

Στον πίνακα 1 φαίνονται όλα τα bHLH γονίδια της *Drosophila melanogaster*, ταυτοποιημένα από τους Ledent and Vervoort (2001) μετά από εξαντλητική επισκόπηση των δημοσιευμένων αλληλουχιών του γενώματος με κατάλληλα υπολογιστικά προγράμματα για πρωτεΐνες με bHLH δομή.

Πίνακας 1: Πλήρης κατάλογος των (55) bHLH γονιδίων της *Drosophila melanogaster*. Τα γονίδια παρατίθενται σύμφωνα με την κλάση που ανήκουν, όπως αυτή έχει ήδη περιγραφεί στο κείμενο. Συμπεριλαμβάνονται οι χρωμοσωμικές τους θέσεις (χαρτογράφηση σε πολυταινικά χρωμοσώματα, όπως αυτή αναφέρεται στη βάση δεδομένων Flybase: www.flybase.org), το καθεστώς χαρακτηρισμού τους (1: γνωστή μόνο η αλληλουχία, 2: γνωστό πρότυπο έκφρασης, 3: στάδιο προκαταρκτικής λειτουργικής ανάλυσης, 4: εκτεταμένη ανάλυση έχει ήδη πραγματοποιηθεί) και οι αριθμοί πρόσβασής τους.

A/A	Όνομα γονιδίου	Χρωμοσωμική περιοχή	Χαρακτηρισμός	Accession no.
1	<i>achaete</i>	1B1	4	gb AAF45498.1
2	<i>amos</i>	37A1-2	3	gb AAF53678.1
3	<i>asense</i>	1B1	4	gb AAF45502.1
4	<i>ato d</i>	84F6	4	gb AAF54209.1
5	<i>cato</i>	53A1-2	2	gb AAF58026.1
6	CG10066	84C3-4	2	gb AAF54058.1
7	CG11450 (<i>net</i>)	21A5-B1	3	gb AAF51562.1
8	CG12561	96F14-97A1	1	gb AAF56569.1
9	CG12648	9A4	1	SPTREMBL:Q9W2Z5
10	CG12952	85D7-10	2	gb AAF54351.1
11	CG17592	4C4	2	gb AAF45953.1
12	CG18144	31D1-6	2	gb AAF52900.1
13	CG18362	39D1-2	1	gb AAF53989.1
14	CG3350	97F5-6	1	gb AAF56696.1
15	CG5545	36C6-7	2	gb AAF53631.1
16	CG5952	89B9-12	2	gb AAF55280.1

A/A	Όνομα γονιδίου	Χρωμοσωμική περιοχή	Χαρακτηρισμός	Accession no.
17	CG6211	13C1	2	gb AAF48439.1
18	CG6913	86F1-2	2	gb AAF54684.1
19	CG8667	39D3	2	gb AAF53991.1
20	<i>clock</i>	66A11-B1	4	gb AAD10630.1
21	<i>crp</i>	35F6-7	1	gb AAF53510.1
22	<i>cycle (MOP3)</i>	76D2-3	3	gb AAF49107.1
23	<i>daughterless</i>	31D11-E1	4	pir_A31641
24	<i>deadpan</i>	44B3-4	4	gb AAB24149.1
25	<i>dellilah</i>	97B1-2	3	gb AAF56590.1
26	<i>diminutive</i>	3D3-4	3	gb AAB39842.1
27	<i>E(spl) m3</i>	96F10-12	4	gb AAF56550.1
28	<i>E(spl) m5</i>	96F10-12	4	emb CAA34552.1
29	<i>E(spl) m7</i>	96F10-12	4	emb CAA34553.1
30	<i>E(spl) m8</i>	96F10-12	4	sp P13098
31	<i>E(spl) mA</i>	96F10-12	4	gb AAA28909.1
32	<i>E(spl) mB</i>	96F10-12	4	gb AAA28910.1
33	<i>E(spl) mC</i>	96F10-12	4	gb AAA28911.1
34	<i>extramacrochaete</i>	61D1-2	4	gb AAF47413.1
35	<i>hairy</i>	66D11-12	4	Mb CAA34018.1
36	<i>Her</i>	17A3	2	gb AAF48810.1
37	<i>Hey</i>	43F9-44A1	1	gb AAF59152.1
38	<i>Hif-1A</i>	99D5-F1	2	gb AAC47303.1
39	HLH106	76D1-3	1	gb AAF49115.1
40	HLH3b	3B3-4	2	gb AAF45802.1
41	HLH4C	4C6-7	2	gb AAF45967.1
42	HLH54F	54E7-9	2	gb AAF57795.1
43	<i>letal of scute</i>	1B1	4	gb AAF45500.1
44	<i>Max</i>	76A3	2	gb AAF49179.1
45	<i>Nautilus</i>	95B3-5	3	SW:P22816
46	<i>Rst(1) JH</i>	10C6-8	3	gb AAC14350.1
47	<i>Scute</i>	1B1	4	gb AAA28313.1
48	<i>Side</i>	37B9-11	2	gb AAF53741.1
49	<i>single-minded</i>	87D12-13	4	gb AAF54902.1
50	<i>Spineless</i>	89C1-2	4	gb AAD09205.1
51	<i>Sticky ch1</i>	86A5-6	3	gb AAF24476.1
52	<i>Tango</i>	85C5-7	4	gb AAF54329.1
53	<i>tap (biparous)</i>	74B1-2	3	emb CAA65103.1
54	<i>Trachealess</i>	61C1	4	gb AAA96754.1
55	<i>Twist</i>	59C2-3	4	emb CAA32707.1

1.6 Τα προνευρικά γονίδια.

Η μελέτη των προνευρικών γονιδίων έχει αρχίσει από τη δεύτερη δεκαετία του περασμένου αιώνα, όταν βρέθηκαν μεταλλαγμένα στελέχη *Drosophila* που στερούνταν (υποσύνολα) εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων. Στα τέλη της δεκαετίας του 1970 βρέθηκε ένας συναθροισμός γονιδίων, ο συναθροισμός AS-C που εμπλεκόταν στη ρύθμιση της πρώιμης νευρογένεσης (Garcia-Bellido 1979). Μετά από μοριακές μελέτες απεδείχθη ότι αποτελείται από τα τέσσερα εξής γονίδια: *achaete* (*ac*), *scute* (*sc*), *lethal of scute* (*l'sc*) και *asense* (*ase*) με έντονες δομικές ομοιότητες με τις πρωτεΐνες Da, Myc και MyoD, όσον αφορά στη bHLH περιοχή τους, που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεσή τους στο DNA και το διμερισμό τους (Gonzalez et al. 1989, Murre et al 1989a, Murre et al 1989b και Villares and Cabrera 1987).

Πέρα από τα γονίδια του AS-C υπάρχουν και άλλα γονίδια που ανήκουν στη κατηγορία των προνευρικών, όπως τα *atonal* (*ato*), *absent MD neurons and olfactory sensilla* (*amos*), *cousin of atonal* (*cato*), που αποτελούν όμως ένα ξεχωριστό υποσύνολο σε σχέση με τα γονίδια του AS-C (Jarman et al. 1993, Goulding et al 2000a, Goulding et al 2000b και Huang et al 2000).

Τα γονίδια *ac* και *sc* χαρακτηρίζονται προνευρικά γιατί εκφράζονται πριν την εκκίνηση της νευρικής διαφοροποίησης σε σύνολα (εκτοδερμικών κατά τη διαδικασία της πρώιμης νευρογένεσης) κυττάρων, που ονομάζονται προνευρικοί συναθροισμοί. Αυτοί μάλιστα είναι διατεταγμένοι κατά τέτοιο τρόπο που αποκαλύπτουν τη μελλοντική θέση των νευρικών προδρόμων κυττάρων στο ΚΝΣ και ΠΝΣ. Ακόμα πιο σημαντικό είναι το γεγονός ότι η έκφρασή τους είναι ικανή και αναγκαία για την ανάπτυξη των νευρικών προδρόμων κυττάρων, καθιστώντας τα κύριους ρυθμιστές της νευρικής τύχης ενεργοποιώντας μετέπειτα γονίδια όπως το *senseless*, *asense*, *deadpan* (Bier et al., 1992; Dominguez and Campuzano, 1993; Jarman et al., 1993; Nolo et al., 2000). Αυτό επιβεβαιώνεται από την ύπαρξη μεταλλαγών έλλειψης ή κέρδους λειτουργίας που αντιστοίχως συνεπάγονται την εξαφάνιση ή τη επιπλέον δημιουργία νευρικών πρόδρομων κυττάρων. Τέλος, όλα τα μέλη των παραπάνω οικογενειών ανήκουν στην κατηγορία των bHLH πρωτεϊνών και επομένως μοιράζονται κοινές βιοχημικές ιδιότητες, όπως πρόσδεση σε αλληλουχίες CASCTG (Campuzano and Modolell 1992, Jan and Jan 1994, Singson et al 1994 και από Bertrand et al 2002).

Είναι ενδιαφέρον ότι τα παραπάνω προνευρικά γονίδια είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό όλου του ΠΝΣ και ενός μεγάλου μέρους, αλλά όχι όλου, του ΚΝΣ. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν και άλλα προνευρικά γονίδια που ακόμη δεν έχουν ανακαλυφθεί. Η επισκόπηση του γονιδιώματος της *Drosophila* έχει υποδείξει την ύπαρξη και άλλων, άγνωστων, bHLH πρωτεϊνών, που ωστόσο καμμιά από αυτές δε δείχνει πρότυπο

έκφρασης χαρακτηριστικό των προνευρικών (Moore et al 2000, Peyrefitte et al 2001). Άρα παραμένει η πιθανότητα κάποια στοιχεία του ΚΝΣ να μη χρειάζονται bHLH, αλλά άλλου τύπου πρωτεΐνες.

Κατά τη διαδικασία της πλευρικής αναστολής τα νευρογόνα γονίδια του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch, των οποίων η συνοπτική περιγραφή ακολουθεί και ιδιαίτερα, τα γονίδια *E(spl)*, ανταγωνίζονται τη δράση των προνευρικών.

1.7 Το Notch σηματοδοτικό μονοπάτι.

1.7.1 Ο υποδοχέας Notch και οι δεσμευτές Delta και Serrate.

Το Notch μονοπάτι φαίνεται να εμπλέκεται σε διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις σε ένα ευρύ φάσμα αναπτυξιακών διαδικασιών σε όλα τα μετάρζωα. Έχει μελετηθεί ιδιαίτερα στη *Drosophila*, όπου παίζει μεταξύ άλλων διαδικασιών παίζει ρόλο στη δόμηση τόσο του ΚΝΣ όσο και του ΠΝΣ (για βιβλιογραφική επισκόπηση βλ. Bray 1998, Egan et al., 1998; Greenwald, 1998; Artavanis-Tsakonas et al., 1999).

Η πρωτεΐνη Notch είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη μονής διέλευσης, μεγέθους 300 kD. Πιο χαρακτηριστική δομική ιδιότητα της πρωτεΐνης είναι οι 36 διαδοχικές επαναλήψεις, τύπου EGF και τρεις επαναλήψεις, πλούσιες σε κυστεΐνη, γνωστές ως Notch/LIN12 επαναλήψεις στο εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης, ενώ στο ενδοκυττάριο τμήμα της βρίσκονται εξι διαδοχικές επαναλήψεις ανκυρίνης, μία πλούσια σε γλουταμίνες περιοχή (ορα περιοχή) και μία PEST αλληλουχία. Η ιστοειδική του έκφραση έχει αναλυθεί τόσο στο έμβρυο όσο και σε μετέπειτα αναπτυξιακά στάδια. Η ευρεία χωροχρονικά έκφραση του Notch συμπίπτει με τη λειτουργία του μονοπατιού στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, στον καθορισμό και σχηματισμό του μεσοδέρματος, της γαμετικής σειράς, των Μαλπιγγειανών σωλήνων, των αισθητηρίων οργάνων, των δομών του ματιού και πολλών άλλων.

Γενετικές και μοριακές μελέτες έχουν οδηγήσει στη ταυτοποίηση των δεσμευτών του Notch, Delta και Serrate. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν χαρακτηριστική δομή μονής διέλευσης διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, η οποία είναι σε κάποιο βαθμό εξελικτικά συντηρημένη σε μεγάλο φάσμα οργανισμών. Ειδικά, στο εξωκυττάριο τμήμα τους περιέχονται επαναλήψεις τύπου EGF, καθώς και μία αλληλουχία πλούσια σε κυστεΐνες, γνωστή ως DSL αλληλουχία. Η τελευταία είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του δεσμευτή, καθώς σημειακές μεταλλαγές σε αυτή την περιοχή προκαλούν έντονους φαινοτύπους έλλειψης λειτουργίας.

1.7.2 Η σηματοδότηση Notch

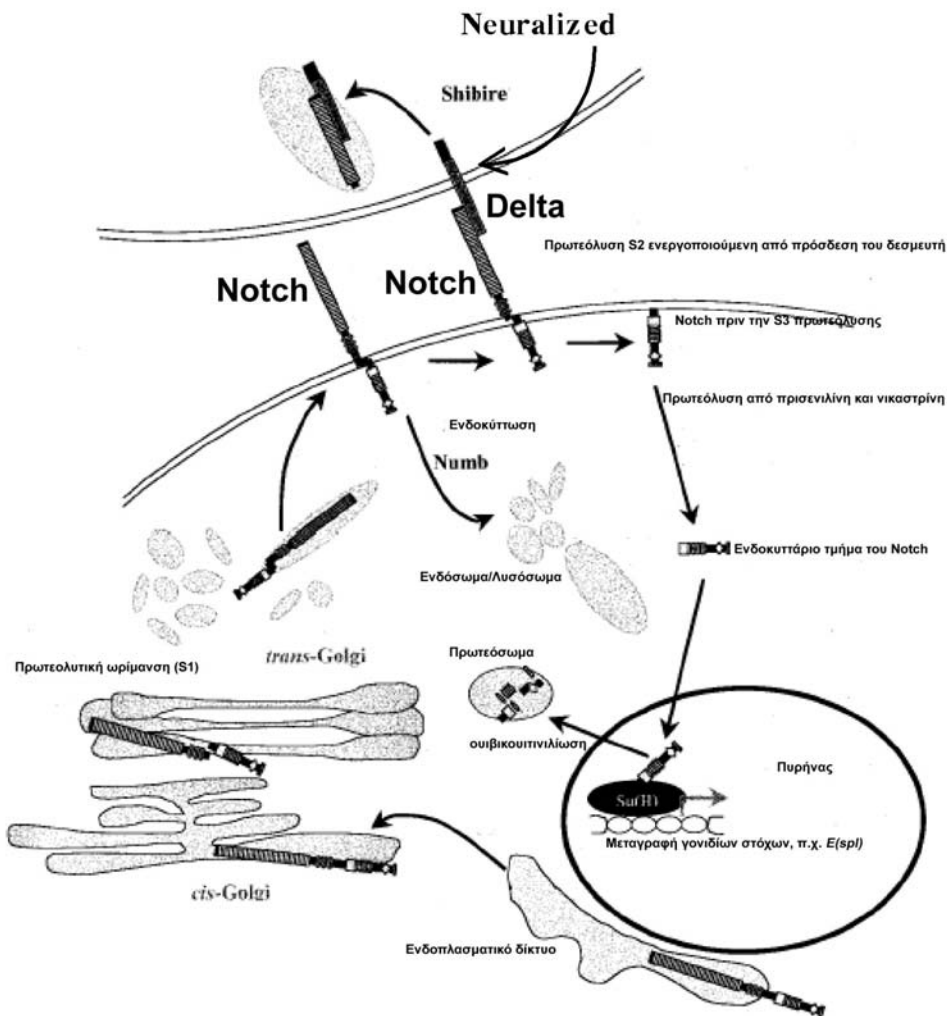
Κατά τη σηματοδότηση Notch (**Εικ. 4**) οι δεσμευτές Delta και Serrate προσδένονται στο εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα, και πιο συγκεκριμένα στη περιοχή που περιέχει τις επαναλήψεις τύπου EGF. Με την πρόσδεση των δεσμευτών επιτυγχάνεται η έναρξη μιας αλυσίδας γεγονότων με απώτερο αποτέλεσμα τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στο κύτταρο που δέχεται το σήμα. Πιο συγκεκριμένα, αρχικά πραγματοποιείται μια σειρά πρωτεολυτικών διασπάσεων του υποδοχέα Notch αποτέλεσμα των οποίων είναι ο διαχωρισμός του εξωκυτταρίου τμήματος του μορίου από το ενδοκυττάριο. Στη θέση S2 και τη απομάκρυνση του μεγαλύτερου τμήματος της εξωκυτταρίας περιοχής. Το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα, συζευγμένο με τη πρωτεΐνη δεσμευτή Delta, ενδοκυττώνεται στο κύτταρο από το οποίο αποστέλλεται το σήμα ενεργοποίησης του μονοπατιού με τρόπο εξαρτώμενο από τη λειτουργία του γονιδίου *shibire*. Το γονίδιο *shibire* κωδικοποιεί μία δυναμίνη με GTPase δραστικότητα, υπεύθυνη για τον αποχωρισμό των περικλειόμενων από κλαθρίνη ενδοκυττωτικών κυστιδίων από την κυτταρική μεμβράνη. Στη διαδικασία αυτή φαίνεται να εμπλέκεται και η πρωτεΐνη *Neutralized*, η οποία μέσω της δραστικότητάς ως E3 λιγάση ουβικουιτίνης προάγει τελικά την ουβικουιτινιλίωση και την ενδοκύτωση του δεσμευτή Delta και τη συνεπακόλουθη *trans*-ενδοκύτωση του εξωκυτταρίου τμήματος του υποδοχέα Notch (Pavlopoulos et al 2001). Το ενδοκυττάριο τμήμα του Notch μεταφέρεται στον πυρήνα αμέσως μετά την ενεργοποίηση όπου σχηματίζει σύμπλοκο με τον μεταγραφικό παράγοντα *Suppressor of Hairless [Su(H)]* και προάγει την έναρξη της μεταγραφής γονιδίων-στόχων. Απουσία του σήματος Notch, η πρωτεΐνη *Su(H)* καταστέλλει τη μεταγραφή μέσω της αλληλεπίδρασης και της επιστράτευσης συγκαταστολέων και απακετυλασών των ιστονών. Η αλληλεπίδραση με το ενδοκυττάριο τμήμα του Notch απομακρύνει τους μεταγραφικούς συγκαταστολείς και τις απακετυλάσες και/ή επιστρατεύει συμπλέγματα ενεργοποιητών της μεταγραφής.

Η αρνητική ρύθμιση του Notch μονοπατιού πραγματοποιείται με συνδυασμό μηχανισμών, που συμπεριλαμβάνουν φωσφορυλίωση, ουβικουιτινιλίωση, ενδοκύτωση και πρωτεολυτική διάσπαση. Γι' αυτές τις διαδικασίες έχει βρεθεί ότι παίζουν ρόλο η πρωτεΐνη *Mastermind*, που συμπεριλαμβάνεται αρχικά στο ενεργοποιητικό μεταγραφικά πρωτεϊνικό σύμπλοκο *Su(H)/Notch*, η E3 λιγάση ουβικουιτίνης *Su(dx)* η πρωτεΐνη *Numb* που αλληλεπιδρώντας με στοιχεία του μηχανισμού της ενδοκύτωσης και ταυτόχρονα με τον υποδοχέα Notch προάγει την ενδοκύτωση του απομακρύνοντάς και παρεμποδίζοντας τη λήψη του σήματος και την ενεργοποίηση του μονοπατιού. Επιπρόσθετοι παράγοντες ρύθμισης του σηματοδοτικού μονοπατιού είναι η πρωτεΐνη *Fringe*, που αποτρέπει την αλληλεπίδραση του υποδοχέα Notch και του δεσμευτή *Serrate*, αλλά ενισχύει την πρόσδεση του *Delta* επιτρέποντας

με αυτόν τον τρόπο την καθιέρωση αναπτυξιακών ορίων και η πρωτεΐνη Scabrous, η οποία προσδενόμενη στο πλήρες μήκους μόριο Notch παρεμποδίζει τη δράση του (Baron 2002).

Ταυτόχρονα υπάρχουν παραδείγματα αναπτυξιακών διαδικασιών, όπου η πρωτεΐνη Su(H) δεν παίζει κανένα ρόλο στη μετάδοση του σήματος Notch. Μία υποψήφια πρωτεΐνη για τη μετάδοση του σήματος Notch είναι η πρωτεΐνη *deltex*, που μπορεί να αλληλεπιδρά με τη πρωτεΐνη Notch. Η *deltex* είναι πιθανό να ενεργοποιεί την ανεξάρτητη του Su(H) μετάδοση του σήματος μέσω της αρνητικής ρύθμισης άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών.

Κατά τη διαδικασία της πλευρικής αναστολής άμεσος μεταγραφικός στόχος του συμπλόκου Su(H)/Notch είναι τα γονίδια του γονιδιακού συμπλέγματος *Enhancer of split* [*E(spl)*], για τα οποία θα γίνει λεπτομερής αναφορά στο επόμενο κεφάλαιο.



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch (από Baron 2002).

1.8 Το γονιδιακό σύμπλοκο *E(spl)-C*.

Ο γενετικός τόπος *E(spl)-C* ονομάστηκε από μία υπερέχουσα μεταλλαγή που ενισχύει το φαινότυπο της μεταλλαγής *spl^{it}*, ενός αλληλόμορφου του *Notch*, στην ανάπτυξη του ματιού (Artanamis Tsakonas 1991). Ενεπλάκη στη λειτουργία της νευρογένεσης και στο σηματοδοτικό μονοπάτι του *Notch* όταν έγινε φανερό ότι μεταλλαγές που αφαιρούν την αντίστοιχη γενωμική περιοχή προξενούν υπερπλασία του εμβρυικού ΚΝΣ καθ' ομοίωση των μεταλλαγών έλλειψης λειτουργίας του *Notch* (Lehman et al 1983). Πειράματα γενετικών αλληλεπιδράσεων έδειξαν ότι ο ρόλος του γενετικού τόπου *E(spl)-C* είναι επιστατικός όλων των νευρογόνων γονιδίων. Κύτταρα νευροεκτοδέρματος εμβρύων που φέρουν έλλειψη του συγκεκριμένου γενετικού τόπου δεν υιοθετούν ποτέ την επιδερμική τύχη μετά από μεταμόσχευση στο νευροεκτόδερμα εμβρύων αγρίου τύπου (Technau and Campos-Ortega 1987). Οι παραπάνω παρατηρήσεις συνεπάγονται ότι τα γονίδια του *E(spl)-C* είναι απαραίτητα για τη λήψη του σήματος του *Notch* κατά τη πλευρική αναστολή στη νευρογένεση.

Ο γενετικός τόπος *E(spl)-C* εκτείνεται σε μία περιοχή 60 kb και περιλαμβάνει μεταξύ άλλων επτά γονίδια δομικά όμοια μεταξύ τους, τα *E(spl)mδ*, *E(spl)mγ*, *E(spl)mβ*, *E(spl)m3*, *E(spl)m5*, *E(spl)m7*, *E(spl)m8* (Delidakis and Artavanis-Tsakonas 1992, Knust et al 1992). Χρωμοσωμικές ελλείψεις στην περιοχή του γονιδιακού συμπλόκου έχουν σαν αποτέλεσμα εκτεταμένη υπερπλασία του ΚΝΣ, της οποίας η έκταση εξαρτάται από τον αριθμό των μεταγραφικών μονάδων που λείπουν (Delidakis et al 1991). Μετά από εκτεταμένες αλλά ανεπιτυχείς προσπάθειες για απόκτηση θανατογόνων σημειακών μεταλλαγών, καθώς και το γεγονός ότι η αφαίρεση ενός από τα γονίδια του συμπλόκου δεν προκαλεί κανένα φαινότυπο, συμπεραίνεται ότι τα γονίδια του συμπλόκου έχουν μερικώς πλεονάζουσα λειτουργία (Delidakis et al., 1991, Delidakis and Artavanis-Tsakonas, 1992; Ligoxygakis et al., 1999). Όλα τα *E(spl)* bHLH γονίδια είναι άμεσοι μεταγραφικοί στόχοι του *Notch* σηματοδοτικού μονοπατιού.

Παρ' όλα αυτά, κάθε ένα από τα *E(spl)* γονίδια έχει ιδιαίτερο πρότυπο έκφρασης. Κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων της εμβρυογένεσης η έκφρασή τους αρχίζει λίγο μετά τον καθορισμό της προνευρικής ομάδας και γίνεται εντονότερη στα κύτταρα που περιβάλλουν τον μελλοντικό νευροβλάστη, όπου δηλαδή η σηματοδότηση μέσω *Notch* είναι ενεργή (Jennings et al 1994). Σε μεταγενέστερα στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης, το πρότυπο έκφρασης διαφοροποιείται για κάποια από τα γονίδια, υποδηλώνοντας ότι και άλλοι παράγοντες πέρα από το *Notch* σηματοδοτικό μονοπάτι ρυθμίζουν την έκφραση των *E(spl)* γονιδίων (Wech et al 1999). Επίσης, στο στάδιο της προνύμφης τα πρότυπα έκφρασης των διάφορων *E(spl)* γονιδίων διαφέρουν αρκετά μεταξύ τους (de Celis et al 1996), υποστηρίζοντας την ύπαρξη πολλαπλών

παραγόντων ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Για παράδειγμα, στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού τα γονίδια *E(spl)m7* και *E(spl)m8* εκφράζονται σε όλους τους προνευρικούς συναθροισμούς, τα σύνολα δηλαδή των κυττάρων από τα οποία θα προκύψουν τα μελλοντικά SOP, σε αντίθεση με το γονίδιο *E(spl)mδ* που εκφράζεται μόνο σε υποσύνολο των προνευρικών συναθροισμών και το γονίδιο *E(spl)mβ* που εκφράζεται μόνο στις περιοχές μεταξύ των νευρώσεων του φτερού. Διαφορές παρατηρούνται και σε άλλους αναπτυξιακούς δίσκους. Οι διαφορές αυτές στο πρότυπο έκφρασης των γονιδίων *E(spl)* τονίζουν, πέρα από την απαίτηση για τη δράση και άλλων παραγόντων ρύθμισης σε συνδυασμό με το μονοπάτι του Notch, και το γεγονός ότι συγκεκριμένες αποφάσεις κυτταρικής ανάπτυξης που εμπλέκουν το Notch σχετίζονται με συγκεκριμένα *E(spl)* γονίδια. Επιπλέον, η συντήρηση του γονιδιακού συμπλόκου μεταξύ δύο ειδών, της *Drosophila melanogaster* και *Drosophila hydei* (Maier et al 1993) τονίζει περαιτέρω το συμπέρασμα ότι το καθένα από τα *E(spl)* γονίδια επιτελεί διακριτές και σημαντικές λειτουργίες κατά την ανάπτυξη του οργανισμού.

1.8.1 Χαρακτηριστικά των *E(spl)* πρωτεϊνών.

Οι επτά *E(spl)* πρωτεΐνες μοιράζονται δομικές ιδιότητες κοινές τόσο μεταξύ τους όσο και με τις πρωτεΐνες Hairy, Deadpan, Hey, Side, Her Stich με τις οποίες συναποτελούν μία συγκεκριμένη υποοικογένεια bHLH πρωτεϊνών, τις bHLH-Orange πρωτεΐνες.

Κατ'αρχήν είναι πρωτεΐνες bHLH, ομάδας B, με ιδιαίτερο χαρακτηριστικό το αμινοξικό κατάλοιπο της προλίνης στη βασική περιοχή. Η συντήρηση της υποδηλώνει ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην (ειδική) πρόσδεση στο DNA. Χαρακτηρίζονται επίσης, από την Orange περιοχή, η οποία είναι πάντα διατεταγμένη καρβοξυτελικά σε σχέση με τη bHLH περιοχή και έχει προταθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ειδικότητα των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων τους και κατ' επέκταση της δράσης τους (Dawson et al 1995). Τέλος, ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των *E(spl)* γονιδίων είναι ότι είναι ενεργοί μεταγραφικοί καταστολείς (Nakao et al 1996, Oellers et al 1994, Tata and Hartley 1995, Ligoxigakis et al 1999). Η εγγενής μεταγραφική κατασταλτική τους ιδιότητα εντοπίζεται στην καρβοξυτελική τετραμινοξική περιοχή WRPW. Η περιοχή αυτή είναι ικανή και απαραίτητη για την αλληλεπίδραση με τον συγκαταστολέα TLE/Groucho (Paroush et al 1994, Fisher et al 1996). Έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη Groucho είναι απαραίτητη για την καταστολή των γονιδίων στόχων in vivo (Paroush et al 1994) και είναι ικανή να καταστείλλει τη μεταγραφή γονιδίων αναφοράς όταν προσδεθεί στο DNA τεχνητά (Fisher et al 1996). Σύμφωνα με τους Chen et al (1999) η πρωτεΐνη Groucho αλληλεπιδρά με την απακετυλάση ιστονών Rpd3. Η αλληλεπίδραση είναι άμεση σύμφωνα με in vitro πειράματα και διαμεσολαβείται μέσω της πλούσιας σε γλυκίνη και προλίνη περιοχής του Groucho. Προτείνεται

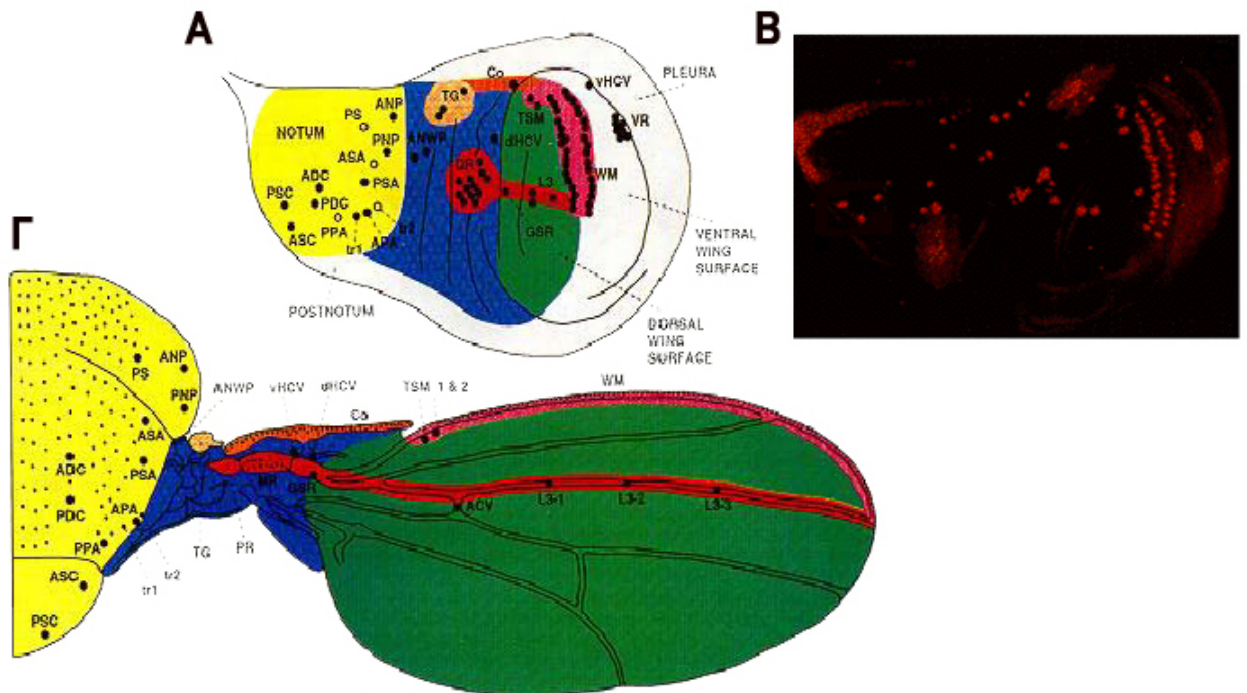
επομένως ότι ένας μηχανισμός με τον οποίο η Groucho είναι ικανή να καταστείλλει τη μεταγραφή είναι μέσω της μετατροπής της χρωματινικής δομής στα γονίδια στόχους.

1.9 Μοντέλο πλευρικής αναστολής κατά το διαχωρισμό του Πρόδρομου Αισθητηρίου Οργάνου κατά την ανάπτυξη τού ΠΝΣ.

Ο μηχανισμός της πλευρικής αναστολής (**Εικ. 6**) μέσω της σηματοδότησης Notch (**Εικ. 4**) έχει μελετηθεί ιδιαίτερα καλά στην περίπτωση της γένεσης του πρόδρομων αισθητηρίων κυττάρων στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού, που αργότερα κατά την ανάπτυξη θα δώσουν τις μηχανοαισθητήριες σμήριγγες. Στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού η έκφραση των προνευρικών γονιδίων *ac* και *sc*, που επιτυγχάνεται με τη συνδυαστική δράση ενός προκαθορισμένου προτύπου μεταγραφικών παραγόντων στις *cis* ρυθμιστικές περιοχές-ενισχυτές των εν λόγω γονιδίων, σε συναθροισμούς κυττάρων, είναι η αιτία για την απόκτηση από τα κύτταρα αυτά της ικανότητας να ακολουθήσουν το νευρικό αναπτυξιακό δυναμικό. Οι συναθροισμοί των κυττάρων αυτών ονομάζονται προνευρικοί συναθροισμοί. Ένας τυπικός προνευρικός συναθροισμός αποτελείται από 20 με 30 κύτταρα, αλλά το μελλοντικό πρόδρομο αισθητήριο κύτταρο θα προέλθει από ένα υποσύνολο του προνευρικού συναθροισμού, που χαρακτηρίζεται προνευρικό πεδίο. Στο προνευρικό πεδίο παρατηρείται ότι τα επίπεδα έκφρασης των προνευρικών πρωτεϊνών είναι υψηλότερα από τα γειτονικά τους στο προνευρικό συναθροισμό. Το μελλοντικό πρόδρομο κύτταρο συσσωρεύει μάλιστα ακόμα υψηλότερα επίπεδα προνευρικών πρωτεϊνών. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι το μελλοντικό πρόδρομο κύτταρο καταλαμβάνει πάντα την ίδια θέση στο προνευρικό πεδίο. Στην επόμενη φάση της ανάπτυξης στο μελλοντικό πρόδρομο αισθητήριο κύτταρο εκφράζεται γονίδια στόχους των προνευρικών πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα η προνευρική πρωτεΐνη *Ase*, η οποία παράλληλα με τις προνευρικές πρωτεΐνες είναι υπεύθυνη για τη δρομολόγηση των γεγονότων που οδηγούν στη νευρική διαφοροποίηση (**Εικ. 5**).

Ταυτόχρονα με την επιλογή του πρόδρομου αισθητηρίου οργάνου από το προνευρικό πεδίο, επιτυγχάνεται η αποτροπή των υπόλοιπων κυττάρων του προνευρικού συναθροισμού να ακολουθήσουν την ίδια πορεία. Αντίθετα, αυτά διαφοροποιούνται τελικά προς κύτταρα επιδερμίδας. Σημαντικό ρόλο στη ανασταλτική αυτή διεργασία κατέχει η σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού Notch. Η συσσώρευση των προνευρικών πρωτεϊνών στο μελλοντικό πρόδρομο αισθητήριο κύτταρο θεωρείται ως το νωρίτερο σήμα της δέσμευσής του για τη μελλοντική του αναπτυξιακή πορεία (Cubas et al. 1991; Skeath and Carroll 1991). Έχειδειχθεί ότι όσο περισσότερο προνευρική πρωτεΐνη συσσωρεύεται μέσα σε ένα κύτταρο τόσο πιο ικανό είναι αυτό να σηματοδοτεί στα γειτονικά και τόσο λιγότερο δεκτικό είναι στο να δέχεται αυτό το

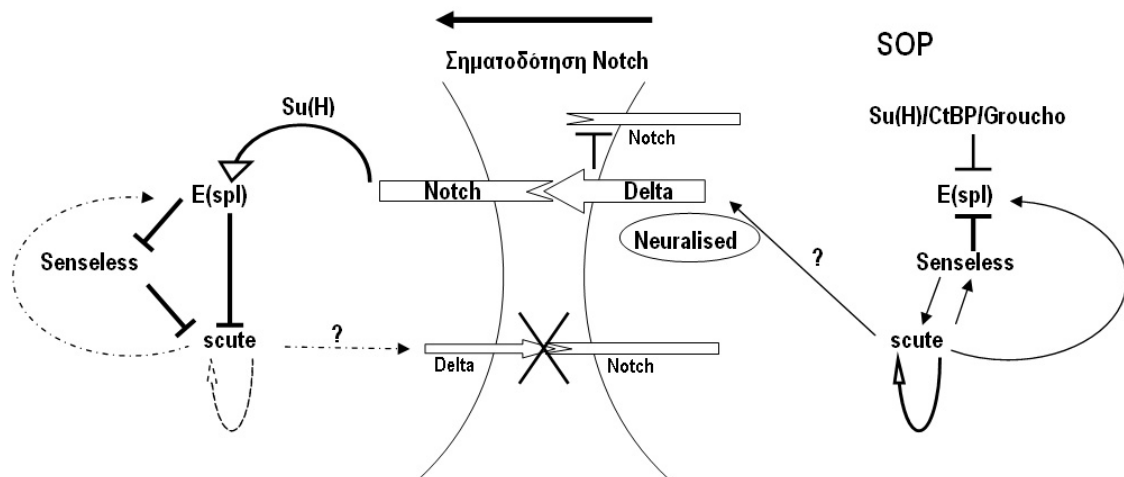
αντίστοιχο σήμα. Με αυτό τον τρόπο το μελλοντικό πρόδρομο αισθητήριο κύτταρο αποδεσμεύεται από το ανασταλτικό σήμα Notch από τα γειτονικά κύτταρα του προνευρικού συναθροισμού και επιλέγεται τελικά αυτό μεταξύ των άλλων (Simpson 1990,1997; Heitzler and Simpson 1991). Η παραπάνω ικανότητα του μελλοντικού πρόδρομου αισθητηρίου οργάνου οφείλεται στην εγκαθίδρυση ασύμμετρης σηματοδότησης μεταξύ των κυττάρων του προνευρικού συναθροισμού, με φορά από το SOP προς τα γειτονικά κύτταρα. Η μοριακή βάση για την ασυμμετρία αυτή έχει προταθεί ότι είναι η θετική μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου *Delta* από



Εικόνα 5: Α) Σχηματική απεικόνιση των στερεότυπων θέσεων των SOP σε αναπτυξιακό δίσκο φτερού 3^{ου} προνευρικού σταδίου, Β) Πείραμα φθορίζοντα ανοσοιστοχημικού εντοπισμού προτύπου έκφρασης του *ase* στα SOP, σε αντίστοιχες θέσεις με αυτές που απεικονίζονται στο Α, Γ) Απεικόνιση των θέσεων των αισθητηρίων οργάνων και ονοματολογική αντιστοίχισή τους με τα SOP που φαίνονται στο Α στο θώρακα και στο φτερό ενήλικου ατόμου *Drosophila melanogaster*. a: πρόσθια (anterior); p: οπίσθια (posterior); SC: scutellar; DC: dorsocentral; NP: notopleural; SA: supra-alar; tr1: 1st sensillum trichodeum, WM: wing margin; Teg: tegula; vR: ventral radius; dR: dorsal radius; L3–2: second sensillum campaniformia of the third vein (από Brand et al 1993 και Huang et al., 1991).

ετεροδιμερή *Da* και *Scute* ή *Achaete* (Heitzler et al 1996). Το παραπάνω μοντέλο αμφισβητήθηκε από τα αποτελέσματα των Pavlou et al (2001), σύμφωνα με τα οποία τα επίπεδα του δεσμευτή *Delta* και του υποδοχέα *Notch* παραμένουν αναλλοίωτα και η έκφραση του γονιδίου *neuralized* στο πρόδρομο νευρικό κύτταρο εντείνει τη δυνατότητα σηματοδότησης του *Delta* στο SOP. Η αύξηση σηματοδότησης από *Delta* από το μελλοντικό SOP το καθιστά ικανό όχι μόνο να "στέλνει" περισσότερο σήμα στα γειτονικά του κύτταρα (όπως είναι προφανές) αλλά και

ταυτόχρονα να μη δέχεται πολύ σήμα από αυτά. Έχει προταθεί άλλωστε ότι η πρωτεΐνη Delta μπορεί να δρα *in cis*, αυτόνομα και ανταγωνιστικά, να δρα δηλαδή στο ίδιο το κύτταρο όπου εκφράζεται παρεμποδίζοντας την σηματοδότηση μέσω Notch (de Celis et al. 1996). Το συνολικό αποτέλεσμα της ρύθμισης αυτής είναι ότι καθιερώνεται ένας ανατροφοδοτικός μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο εντείνεται η διαφορά μεταξύ του πρόδρομου αισθητηρίου κυττάρου και των γειτονικών του. Το Notch μονοπάτι είναι εν τέλει ενεργό σε όλα τα κύτταρα του προνευρικού συναθροισμού αλλά όχι στο πρόδρομο αισθητήριο κύτταρο. Επιπλέον, με τα χαμηλά επίπεδα δραστηριότητας του Notch μονοπατιού, μπορεί να ευνοείται η ανταγωνιστική ως προς τη μετάδοση του σήματος Notch δράση του Hairless (Bang et al. 1995). Με την ενεργοποίηση του μονοπατιού εκφράζονται τα γονίδια *E(spl)* τα οποία στη συνέχεια θα καταστείλουν τη μεταγραφή των προνευρικών πρωτεϊνών, καθώς και στόχους αυτών και θα οδηγήσουν το κύτταρο προς την επιδερμική αναπτυξιακή πορεία.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των ρυθμιστικών αλληλεπιδράσεων κατά τη διαδικασία της πλευρικής αναστολής. **SOP:** πρόδρομο νευρικό κύτταρο. Πιθανότατα, πριν επιλεγθεί το SOP, η σηματοδότηση Notch είναι ισοδύναμη μεταξύ των κυττάρων του προνευρικού συναθροισμού, λόγω της θετικής μεταγραφικής ρύθμισης των *E(spl)* γονιδίων από τις προνευρικές πρωτεΐνες, τα οποία ανταγωνίζονται τη λειτουργία και καταστέλλουν τη μεταγραφή των *Senseless* και προνευρικών. Η αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης *Sc* έχει θετικό αποτέλεσμα στη μεταγραφή του ίδιου γονιδίου μέσω του SMC ενισχυτή. Η σηματοδότηση Notch προς το γειτονικό κύτταρο ενισχύεται λόγω ταυτόχρονης έκφρασης *neuralised*. Επιπλέον, τα υψηλά επίπεδα *DI* μπλοκάρουν το εισερχόμενο σήμα λόγω *in cis* αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα *N*. Στο τελευταίο, η ενεργοποίηση του μονοπατιού οδηγεί στην αυξημένη έκφραση των γονιδίων *E(spl)*, τα οποία δρουν κατασταλτικά επί της μεταγραφής των προνευρικών γονιδίων, πιθανότατα σε συνεργασία και με άλλους παράγοντες, όπως το *Senseless* (το οποίο σε χαμηλά επίπεδα καταστέλλει την έκφραση των προνευρικών γονιδίων). Στο SOP κύτταρο, όπου τα επίπεδα σηματοδότησης Notch είναι χαμηλά, τα υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης *Senseless* καταστέλλουν (παράλληλα με το κατασταλτικό σύμπλεγμα της πρωτεΐνης *Su(H)*/συγκαταστολέων) τη μεταγραφή των *E(spl)* γονιδίων και συνεργάζονται με τις προνευρικές πρωτεΐνες για την δρομολόγηση της νευρικής διαφοροποίησης (τροποποιημένο από Culi et al 1998 και Jafar-Nejad et al 2003).

Έχει προσδιοριστεί ότι η αύξηση των προνευρικών πρωτεϊνών στο μελλοντικό SOP είναι προϊόν της δράσης ενός ενισχυτή, επονομαζόμενου SMC, ευρισκομένου στη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου *Scute* και μέσω αυτής επιτελείται μία θετική αυτορύθμιση της μεταγραφής. Ο ενισχυτής αυτός είναι εξελικτικά συντηρημένος και αποτελεί έναν από τους στόχους του Notch μονοπατιού *in vivo*. Με άλλα λόγια η θετική αυτορύθμιση των προνευρικών πρωτεϊνών αποτελεί έναν από τους πρωταρχικούς στόχους της δράσης των *E(spl)* πρωτεϊνών (Culi et al 1998).

1.10 Μηχανισμοί δράσης των πρωτεϊνών *E(spl)*.

Έχουν προταθεί διάφοροι τρόποι και στόχοι δράσης των πρωτεϊνών *E(spl)*. Σύμφωνα με μία από τις υποθέσεις που έχουν προταθεί είναι ότι μπορούν να δρουν σαν την πρωτεΐνη *extamacrochaete*, δηλαδή να σχηματίζουν διμερή με τις προνευρικές πρωτεΐνες *bHLH*, ανάμεσα να προσδεθούν στις αντίστοιχες αλληλουχίες DNA (Alifragis et al., 1997; Sasai et al 1992, Kageyama and Nakanishi, 1997). Η πιθανότητα αυτή έχει σήμερα αμφισβητηθεί εντόνως (Jimenez and Ish-Horowicz 1997).

Οι *E(spl)* πρωτεΐνες είναι πράγματι ενεργοί μεταγραφικοί καταστολείς και μπορούν να δρουν ως άμεσα προσδεδεμένοι στο DNA μεταγραφικοί παράγοντες. Σε αυτό συνηγορούν η συντήρηση της βασικής τους περιοχής, προφανώς άμεσα συνδεδεμένη με την εκδήλωση της δραστηριότητάς τους, καθώς και η αποδεδειγμένη ικανότητά τους να προσδένονται σε συγκεκριμένες DNA αλληλουχίες *in vitro* και να καταστέλουν συγκεκριμένα γονίδια αναφοράς *in vivo* (Ohsako et al 1994, van Doren et al 1994, Jennings et al 1999).

Ωστόσο υπάρχουν μια σειρά πειραματικών δεδομένων, βάσει των οποίων έχει εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι *E(spl)* πρωτεΐνες μπορούν να δρουν ανεξαρτήτως πρόσδεσης στο DNA. Σε αυτό άλλωστε είχε αρχικά στηριχθεί η πρώτη υπόθεση των ανενεργών διμερών με τις προνευρικές πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, μετάλλαξη των θέσεων πρόσδεσης των *E(spl)* πρωτεϊνών στον ενισχυτή SMC δεν έχει καμμία επίπτωση στην πλευρική αναστολή, αφού ο ενισχυτής παραμένει ενεργός μόνο στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα χωρίς να εξαπλώνεται η έκφρασή του στα γειτονικά κύτταρα του προνευρικού συναθροισμού (Culi et al 1998). Επίσης, στο παρελθόν, έχουν περιγραφεί μεταλλάξεις που ενώ επηρεάζουν την βασική περιοχή, οι *E(spl)* πρωτεΐνες διατηρούν τη δραστηριότητά τους (Giebel and Campos-Ortega 1997; Nakao and Campos-Ortega 1996; Oellers et al., 1994). Η ερμηνεία που δίνεται μέχρι στιγμής για την ερμηνεία αυτών των παρατηρήσεων είναι ότι οι *E(spl)* πρωτεΐνες μπορούν να στρατολογηθούν μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων για να αποκτήσουν (έστω σε μικρότερο βαθμό) πρόσβαση στις ρυθμιστικές αλληλουχίες γονιδίων στόχων για την καταστολή της μεταγραφής τους (Culi et al 1998, Jimenez et al 1997).

Έχει ήδη προαναφερθεί ότι οι πρωτεΐνες bHLH έχουν την ικανότητα ομο- και ετερο-διμερισμού μεταξύ τους. Υπενθυμίζεται μάλιστα ότι οι E(spl) πρωτεΐνες ανήκουν σε μία ευρύτερη υποοικογένεια των bHLH πρωτεϊνών, την υποοικογένεια των bHLH-Orange πρωτεϊνών. Τα υπόλοιπα μέλη αυτής της υποοικογένειας, περιλαμβάνουν [πέρα από τις 7 E(spl) πρωτεΐνες (mβ, mγ, mδ, m3, m5, m7, m8)] και τις πρωτεΐνες Hairy (H), Deadpan (Dpn), Sticky chordotonal (Stich), Similar to Deadpan (Side), Hairy-E(spl) related (Her) και Hairy-E(spl) related with YRPW (Hey), οι περισσότερες από τις οποίες είναι ελάχιστα ως καθόλου μελετημένες (Ledent and Vervoort 2001, Moore et al 2000, Πίν. 1). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η πρωτεΐνη Hey, καθώς μελέτες σε ορθόλογα γονίδια σπονδυλωτών, έχουν αποκαλύψει ότι αυτά είναι άμεσοι μεταγραφικοί στόχοι του Notch και επιπλέον, οι αντίστοιχες πρωτεΐνες συνεργάζονται με τις Hes πρωτεΐνες, που είναι ομόλογες με τις E(spl), για την αποτελεσματικότερη καταστολή γονιδίων στόχων (Iso et al 2003).

2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ (ΜΕΡΟΣ Β)

2.1 Πρωτεΐνες Hey και σηματοδότηση Notch.

Το εξελικτικά συντηρημένο σηματοδοτικό μονοπάτι Notch επηρεάζει την κυτταρική τύχη μέσω διακυτταρικής επικοινωνίας ρυθμίζοντας διαδικασίες όπως κυτταρική επιβίωση, διαίρεση και διαφοροποίηση (Greenwald 1998, Artavanis-Tsakonas et al. 1999, Miele and Osborne 1999). Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα συστατικά του μονοπατιού απομονώθηκαν αρχικά ως νευρογόνα γονίδια στη *Drosophila*, καθώς οι φαινότυποι μεταλλαγών έλλειψης λειτουργίας των γονιδίων αυτών χαρακτηρίζονταν από τον σχηματισμό αυξημένου αριθμού νευροβλαστών εις βάρος των επιδερμικών πρόδρομων κυττάρων (Egan et al 1998, Greenwald 1998, Artavanis-Tsakonas et al. 1999).

Η νευρογένεση δεν είναι η μόνη διαδικασία στην οποία το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch κατέχει έναν κεντρικό ρόλο. Επιπλέον, εμπλέκεται σε αναπτυξιακές διαδικασίες που αφορούν στην ανάπτυξη οργάνων προερχόμενα και από τις τρεις βλαστικές στοιβάδες (Hartenstein et al 1992). Στα σπονδυλωτά ειδικά, ο πλειοτροπικός ρόλος του Notch μονοπατιού κατά την ανάπτυξη αποδεικνύεται από το ότι μεταλλαγές έλλειψης λειτουργίας των Notch υποδοχέων και των αντίστοιχων δεσμευτών τους οδηγούν σε αναπτυξιακές ανωμαλίες πολλών ιστών, συμπεριλαμβανομένων αγγείων, τού θύμου αδένος, της κρανιοεγκεφαλικής περιοχής των ακρών, των σωματιών, του κεντρικού νευρικού συστήματος, της καρδιάς, των νεφρών και των αιματοποιητικών κυττάρων (Conlon et al 1995, de la Pompa et al 1997, Hrabe de Angelis et al 1997, Sidow et al 1997, Jiang et al 1998, Kusumi et al 1998, Hamada et al 1999, Xue et al 1999, Krebs et al 2000, McCright et al 2001, Dunwoodie et al 2002).

Οι πιο γνωστοί μεταγραφικοί στόχοι και ταυτόχρονα διεκπεραιωτές του μονοπατιού Notch είναι γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες-μέλη της HES/E(spl) οικογένειας. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι πρωτεΐνες bHLH και δρουν ως μεταγραφικοί καταστολείς (Ohsako et al 1994, Van Doren et al 1994, Chen et al 1997). Για παράδειγμα, στα θηλαστικά οι πρωτεΐνες Hes1 και Hes5 επάγονται κατόπιν σηματοδότησης μέσω Notch και είναι απαραίτητες για την καταστολή ιστοειδικών μεταγραφικών παραγόντων και κατ' επέκταση την παρεμπόδιση της νευρικής διαφοροποίησης των νευρικών προδρόμων κυττάρων στο έμβρυο του ποντικού (Otsuka et al 1999), κατ' αναλογία με τις E(spl) πρωτεΐνες στη μύγα.

Ωστόσο, η ιστοειδική κατανομή των υποδοχέων Notch και των δεσμευτών τους δεν ταυτίζεται πάντα με το πρότυπο έκφρασης των Hes πρωτεϊνών. Επίσης, οι φαινότυποι που προκύπτουν σε διάφορους ιστούς, των οποίων η ανάπτυξη επηρεάζεται από το Notch μονοπάτι, μετά από μετάλλαξη μεμονομένων Hes γονιδίων είναι ηπιότεροι από τους αντίστοιχους φαινότυπους που παρατηρούνται σε μεταλλάξεις του Notch. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στη διαμόρφωση της υπόθεσης ότι πρέπει να υπάρχουν επιπρόσθετοι, μη ταυτοποιημένοι ακόμη διεκπεραιωτές του μονοπατιού Notch, που πιθανόν να συνεργάζονται με τις Hes πρωτεΐνες.

Πρόσφατα, η προσοχή στράφηκε σε μια καινούρια οικογένεια πρωτεϊνών bHLH-Orange, επονομαζόμενες Hey (Hairy/E(spl) related with a YRPW) (Leimster et al 1999, Steidl et al 2000). Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής είναι επίσης γνωστές ως Hesr (Hairy/E(spl) related) (Kokubo et al 1999, Satow et al 2001), HRT (Hairy related transcription factor) (Nakagawa et al 1999), CHF (Cardiovascular Helix loop helix factor) (Chin et al 2000), gridlock (Zhong et al 2000), Herp (Hairy/E(spl) related repressor protein) (Iso et al 2001, Iso et al 2002) (Πίν. 2). Η ομοιότητά τους με τις Hes πρωτεΐνες ήταν η βασική αιτία για την υπόθεση ότι οι Hey πρωτεΐνες μπορεί να είναι νέοι στόχοι και διεκπεραιωτές του Notch μονοπατιού. Η υπόθεση αυτή υποστηρίχθηκε περαιτέρω όταν παρατηρήθηκε ότι το πρότυπο έκφρασής τους αλληλοεπικαλύπτεται μερικώς με το πρότυπο έκφρασης των Hes πρωτεϊνών. Ορισμένα μάλιστα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι Hey πρωτεΐνες είναι διεκπεραιωτές της σηματοδότησης Notch είτε από μόνες τους είτε σε συνεργασία με τις Hes πρωτεΐνες.

Πίνακας 2: Ονοματολογία της πρωτεϊνικής οικογένειας HERP

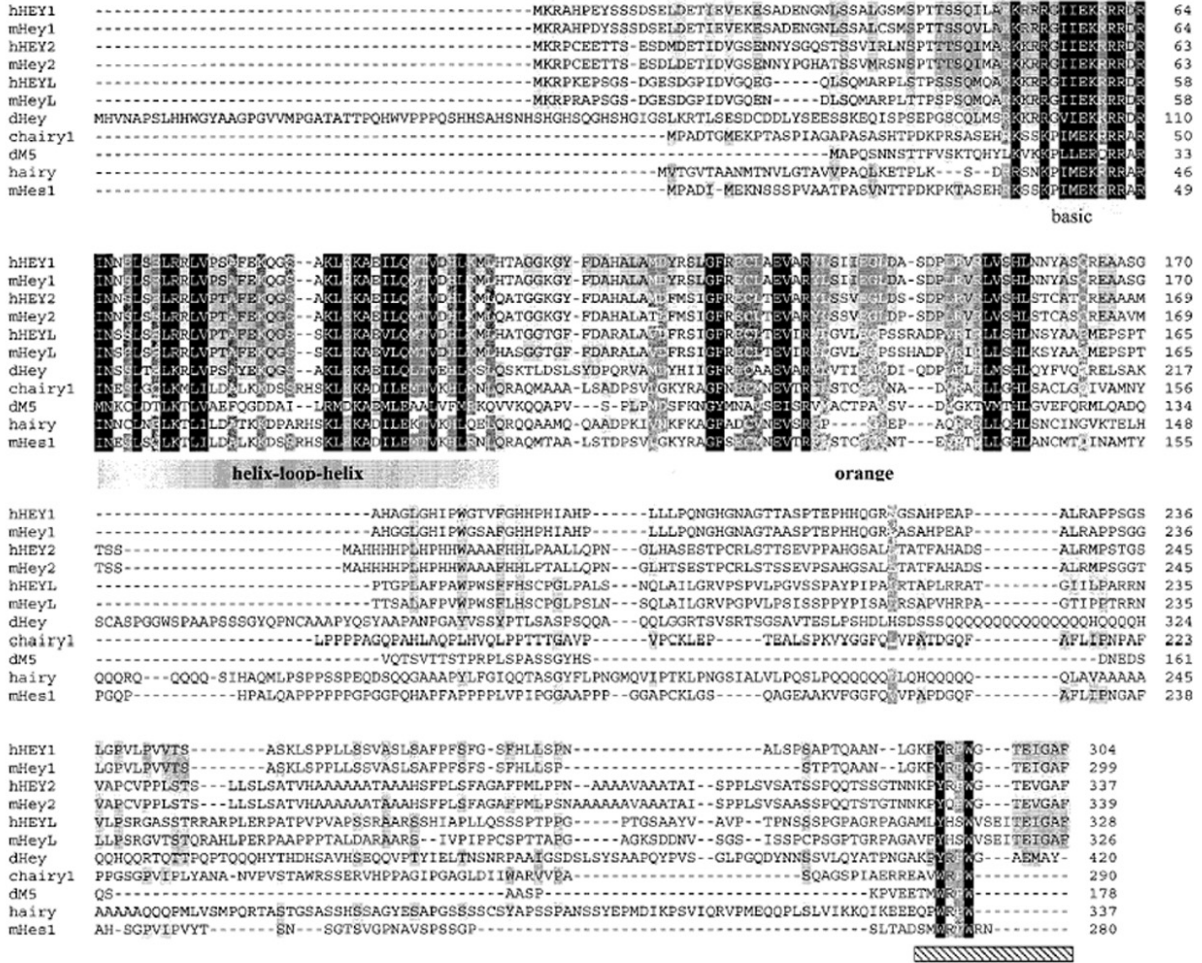
Πλήρες όνομα	Συντόμηση		
	1	2	3
Hey (Hairy/E(spl)-related with YRPW)	Hey2	Hey1	HeyL
Hesr (Hairy/E(spl)-related)		Hesr1	
HRT (Hairy-related transcription factor)	HRT2	HRT1	HRT3
CHF (Cardiovascular helix-loop- helix factor)	CHF1	CHF2	
Herp (HES-related repressor protein)	HERP1	HERP2	
gridlock (Zebrafish ορθόλογο γονίδιο)	gridlock		
dHey (<i>Drosophila</i> ορθόλογο γονίδιο)	dHey		

2.2 Δομικές ομοιότητες και διαφορές πρωτεϊνών Hey-Hes. Κατάταξη των πρωτεϊνών bHLH Hey.

Μέχρι σήμερα, στα θηλαστικά έχουν ταυτοποιηθεί επτά πρωτεΐνες Hes (από Iso et al 2003) και τρεις πρωτεΐνες Hey (Hey1-3) (Kokubo et al 1999, Leimster et al 1999, Nakagawa et al 1999, Chin et al 2000, Zhong et al 2000, Iso et al 2001). Οι δύο οικογένειες μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά. Τα μέλη των δύο οικογένειών έχουν περιοχή bHLH καθώς και περιοχή Orange (ή αλλιώς επονομαζόμενη έλικες 3 και 4), πάντα διατεταγμένη καρβοξυτελικά της bHLH περιοχής. Η σύσταση και ακολουθία των αμινοξέων των δύο παραπάνω περιοχών είναι παρόμοιες μεταξύ των μελών της κάθε οικογένειας, διαφέρουν όμως μεταξύ των δύο διαφορετικών οικογενειών. Οι πιο αξιοσημείωτες διαφορές που διαχωρίζουν την οικογένεια Hey από την οικογένεια Hes/E(spl) είναι οι εξής:

Οι πρωτεΐνες Hes περιέχουν μία προλίνη στη βασική τους περιοχή, η οποία είναι εξελικτικά συντηρημένη σε βαθμό τέτοιο που οι πρωτεΐνες Hes να χαρακτηρίζονται ως προλίνης πρωτεΐνες bHLH. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες Hey φέρουν μία γλυκίνη στην αντίστοιχη θέση της αμινοξικής τους αλληλουχίας. Επιπλέον, όλες οι Hes πρωτεΐνες φέρουν το τετραπεπτίδιο WRPW στο καρβοξυτελικό τους άκρο, ενώ οι πρωτεΐνες Hey έχουν αντ' αυτού το τετραπεπτίδιο YRPW ή παραλλαγές αυτού. Τέλος, οι Hey πρωτεΐνες των θηλαστικών φέρουν μία συντηρημένη περιοχή, της οποίας η αμινοξική αλληλουχία είναι TE(V/I)GAF, καρβοξυτελικά τοποθετημένη σχετικά με το προαναφερόμενο τετραπεπτίδιο. Η περιοχή αυτή απουσιάζει από τις Hes πρωτεΐνες.

A



B

	hHey1p	hHey2p	hHeyL	mHey1_p	mHey2_p	mHeyL_p	xHey1_p	zhey1_p	zHeyL_p	dHeyp
hHey1p	100%									
hHey2p	60.9%	100%								
hHeyL_p	50.5%	47.2%	100%							
mHey1_p	96.0%	60.7%	50.7%	100%						
mHey2_p	60.7%	94.1%	46.2%	60.4%	100%					
mHeyL_p	49.6%	46.3%	81.9%	50.0%	45.3%	100%				
xHey1_p	82.9%	57.8%	50.9%	82.1%	57.4%	49.3%	100%			
zhey1_p	75.7%	56.1%	47.4%	76.9%	55.8%	47.7%	73.6%	100%		
zHeyL_p	53.6%	50.4%	53.7%	53.2%	49.6%	54.3%	54.6%	50.2%	100%	
dHeyp	41.1%	40.2%	38.1%	41.6%	39.8%	36.8%	43.3%	40.5%	39.5%	100%

Εικόνα 7: Α) Πολλαπλή στοίχιση των Hey πρωτεϊνών. Συμπεριλαμβάνονται πρωτεΐνες της ευρύτερης οικογένειας των bHLH-Orange πρωτεϊνών. Γ) Πίνακας ομολογίας των διάφορων Hey πρωτεϊνών μεταξύ τους: hHey, mHey, dHey, xHey, zHey από άνθρωπο, ποντίκι, *Drosophila*, *Xenopus* και zebrafish αντιστοιχώς.

Είναι λοιπόν φανερό από τα παραπάνω ότι οι Hey πρωτεΐνες σχετίζονται δομικά με τις πρωτεΐνες Hes, έχοντας όμως ταυτόχρονα δική τους ταυτότητα. Προς επίρρωση του συμπεράσματος αυτού, φυλογενετική ανάλυση των bHLH περιοχών αντιπροσωπευτικών μεταγραφικών παραγόντων δείχνει ότι οι Hey πρωτεΐνες συγκροτούν ένα διακριτό υποσύνολο bHLH πρωτεϊνών (Vasiliauskas and Stern 2000, Bessho et al 2001, Davis and Turner 2001, Teramoto et al 2001).

2.3 Ειδικότητα πρόσδεσης των πρωτεϊνών Hey.

Οι πρωτεΐνες Hey φαίνεται να ανήκουν στις bHLH-Orange, όπου ανήκουν οι Hes πρωτεΐνες των θηλαστικών, όπως και οι πρωτεΐνες Hairy και E(spl) της *Drosophila*. Οι πρωτεΐνες bHLH της ομάδας αυτής είναι μεταγραφικοί καταστολείς που προσδένονται σε αλληλουχίες τύπου C (CACGNG) καθώς και σε αλληλουχίες N (CACNAG). Οι πρωτεΐνες Hes και E(spl) προσδένονται και σε αλληλουχίες τύπου B (CACGTG) (Ohsako et al 1994, Van Doren et al 1994, Fischer and Caudy 1998, Jennings et al 1999). Συγκεκριμένα, οι θέσεις πρόσδεσης των Hey πρωτεϊνών καθορίστηκαν με πειράματα υστέρησης ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (Nakagawa et al 2000, Iso et al 2001). Η αμινοξική αλληλουχία στη βασική περιοχή της πρωτεΐνης Hey2 είναι παρόμοια με την αλληλουχία της Hes1 και, όπως η Hes1, η Hey2 μπορεί να προσδένεται αλληλουχίες της τάξης C και B, αν και πιθανότατα με διαφορετική συγγένεια. Η Hey1 επίσης προσδένεται σε αλληλουχίες τάξης C και B (Nakagawa et al 2000, Iso et al 2001). Περίεργως, η ανθρώπινη Hey3 δεν προσδένεται σε αλληλουχίες τάξης B ((Nakagawa et al 2000). Ιδιαίτερη έκπληξη προκάλεσε η παρατήρηση ότι οι Hey1 και Hey2 μπορούν επίσης να προσδένονται σε αλληλουχίες τάξης A (Iso et al 2001).

Η εκτεταμένη συντήρηση της προλίνης στη βασική περιοχή των Hes πρωτεϊνών και της γλυκίνης στην αντίστοιχη θέση των Hey πρωτεϊνών υποδηλώνει πιθανότατα ένα σημαντικό ρόλο για τα αμινοξικά αυτά κατάλοιπα στην ειδικότητα πρόσδεσης των πρωτεϊνών στο DNA, αν και ακόμη αυτό δεν έχει αποδειχθεί. Αντίθετα μάλιστα, μεταλλαγή της γλυκίνης σε προλίνη στην πρωτεΐνη Hey1 δεν επηρεάζει σημαντικά τη λειτουργικότητά της, δηλαδή την καταστολή της δραστηριότητας του υποκινητή της μυογενίνης ή την καταστολή της μυογόνου δράσης της πρωτεΐνης MyoD σε καλλιέργεια κυττάρων 10T1/2 (Sun et al 2001).

2.4 Μηχανισμοί καταστολής από τις πρωτεΐνες Hey.

Η σημαντικότερη απόδειξη ότι οι πρωτεΐνες Hey είναι μεταγραφικοί καταστολείς προέκυψε από πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυτταρικών σειρών, που έδειξαν ότι η Hey2 καταστέλλει τη μεταγραφή του ίδιου γονιδίου Hey2 και ότι αυτή η καταστολή είναι εξαρτώμενη

μόνο από τη bHLH περιοχή της (Nakagawa et al 2000). Σε συμφωνία με τα παραπάνω δεδομένα, η έκφραση χιμαιρικών μορφών των Hey1 και Hey2 πρωτεϊνών, συντηγμένων μεταφραστικά με την ετερόλογη περιοχή πρόσδεσης DNA του GAL4 μεταγραφικού ενεργοποιητή, οδήγησε στην καταστολή της μεταγραφής κατάλληλου γονιδίου αναφοράς, του οποίου η έκφραση κατευθύνεται από ένα σύνθετικό ενισχυτή με θέσεις πρόσδεσης του GAL4 (Iso et al 2001). Περαιτέρω πειράματα στο ίδιο σύστημα, στα οποία εξετάστηκε η δραστηριότητα τμημάτων της πρωτεΐνης Hey2, πάντα σε σύντηξη με την GAL4 περιοχή πρόσδεσης του DNA, επιβεβαίωσαν ότι η bHLH περιοχή της πρωτεΐνης είναι αυτή που ευθύνεται για την κατασταλτική της δράση και όχι το καρβοξυ-τελικό τετραπεπτιδίο YQPW (Iso et al 2001). Πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι το αντίστοιχο τετραπεπτιδίο WRPW στις Hes/E(spl) πρωτεΐνες κατέχει κρίσιμο ρόλο για την κατασταλτική τους δράση, καθώς μέσω αυτού στρατολογείται ο συγκαταστολέας TLE/Groucho (Wainwright and Ish-Horowicz 1992, Paroush et al 1994, Fisher et al 1996, Giebel and Campos-Ortega 1997). Επομένως, πιθανότατα, δεν είναι απαραίτητη η στρατολόγηση TLE πρωτεϊνών για καταστολή από τις Hey πρωτεΐνες. Πιο αναλυτικά, έχει προταθεί ότι η bHLH περιοχή της Hey2 είναι ικανή και απαραίτητη για την άμεση στρατολόγηση ενός συμπλέγματος συγκαταστολέων που συμπεριλαμβάνει τις πρωτεΐνες N-CoR, mSin3A και την έμμεση αλληλεπίδραση με το συγκαταστολέα HDAC1 (Iso et al 2001).

Ως αντίλογος στα παραπάνω δεδομένα παρουσιάζονται τα συμπεράσματα από μελέτες στο γονίδιο *Hey2* (gridlock) στο zebrafish βασισμένες κυρίως στην υπομορφική μεταλλαγή έλλειψης λειτουργίας του γονιδίου, *grlm145*, που απομονώθηκε σε μία μεγάλης κλίμακας επισκόπηση για ταυτοποίηση αναπτυξιακών μεταλλαγών μετά από χημική μεταλλαξιγένεση (Weinstein et al 1995, Zhong et al 2000). Ο φαινότυπος της μεταλλαγής συνίσταται στην επιλεκτική διατάραξη της συγκρότησης της αορτής με αποτέλεσμα τη διακοπή της κυκλοφορίας του αίματος προς το οπίσθιο μέρος του σώματος και την ουρά του αναπτυσσόμενου ατόμου, καθώς παρεμποδίζεται η ζεύξη των δύο προσθιοπλευρικών αρτηριών με τη ραχιαία αορτή. Η μοριακή βάση της μεταλλαγής μερικής έλλειψης λειτουργίας του γονιδίου, έγκειται στην αλλαγή τού κωδικονίου λήξης του γονιδίου σε αμινοξύ γλυκίνης με αποτέλεσμα η ακολουθία της πρωτεΐνης να προεκτείνεται κατά 44 αμινοξέα στο καρβοξυτελικό άκρο της. Ίσως μία τέτοια τροποποίηση να εμποδίζει την αλληλεπίδραση με τις αντίστοιχες TLE πρωτεΐνες του zebrafish. Ο φαινότυπος της μεταλλαγής διασώζεται με την ένεση αγρίου τύπου mRNA στο μεταλλαγμένο άτομο, αλλά όχι με την ένεση mRNA που στερείται την τελική καρβοξυτελική YRPW περιοχή (Zhong et al 2000).

Η περιοχή Orange επίσης φαίνεται να εμπλέκεται σε επιπρόσθετους μηχανισμούς μεταγραφικής καταστολής από τις Hey πρωτεΐνες (Chin et al 2000, Sun et al (2001). Η πρωτεΐνη

CHF1 (Hey2) αλληλεπιδρώντας με την πρωτεΐνη ARNT, προκαλεί την απομάκρυνσή της από το DNA και την επακόλουθη καταστολή της (εξαρτώμενης από την ARNT) μεταγραφής του *VEGF* υποκινητή. Η κατασταλτική δραστηριότητα της CHF1 εντοπίζεται στη bHLH-Orange περιοχή. Αντιθέτως, το τελικό τετραπεπτικό YRPW δεν είναι καθόλου απαραίτητο για τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης (Chin et al 2000). Κατ' αναλογία, οι πρωτεΐνες CHF1 (Hey2) και CHF2 (Hey1) καταστέλλουν την διαμεσολαβούμενη από τη MyoD θετική μεταγραφική ρύθμιση του υποκινητή της μυογενίνης, καθώς και τη μυογενή μετατροπή των κυττάρων, που επιφέρει η δράση της MyoD (Sun et al 2001). Πιο λεπτομερής εξέταση της λειτουργίας της CHF2 (Hey1) έδειξε ότι η καταστολή επιτυγχάνεται πιθανότατα λόγω της παρεμπόδισης της πρόσδεσης των ετεροδιμερών MyoD-E47 στις αντίστοιχες E θέσεις, εξαιτίας της πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης MyoD και CHF2 (Hey1). Η κατασταλτική ιδιότητα της CHF2 εντοπίζεται στην ευρύτερη καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης, συμπεριλαμβανομένης της περιοχής Orange, όπως προέκυψε από την εξέταση της δραστηριότητας του υποκινητή της μυογενίνης και του ποσοστού μυογενούς μετατροπής των κυττάρων μετά από παροδική διαμόλυνσή τους ταυτόχρονα με MyoD και με μεταλλαγμένες μορφές του CHF2 γονιδίου, που κωδικοποιούν μεμονωμένες περιοχές της πρωτεΐνης (Sun et al 2001). Το τετραπεπτικό YRPW, αλλά και η bHLH περιοχή της CHF2 (Hey1) υπό τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, είναι μη απαραίτητα για τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης.

Συμπερασματικά, τόσο οι Hes όσο και οι Hey πρωτεΐνες δεν έχουν καλά χαρακτηρισθεί. Η ικανότητά τους για αλληλεπιδράσεις με διάφορες πρωτεΐνες, καθώς και οι διάφορες ενεργότητες που επιδεικνύουν ανάλογα με την πειραματική μέθοδο είναι ενδείξεις για την πλειοτροπική τους δράση.

2.5 Πρωτεΐνες Hey: στόχοι και διεκπεραιωτές του Notch μονοπατιού;

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι τα γονίδια Hey1-3 είναι πιθανοί μεταγραφικοί στόχοι του Notch μονοπατιού. Οι υποκινητές των γονιδίων Hey1-3 ενεργοποιούνται από το συστατικά ενεργό ενδοκυττάριο τμήμα του Notch (NICD) σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυτταρικών σειρών (Maier and Gessler 2000, Nakagawa et al 2000, Iso et al 2002). Επιπρόσθετα, τα ενδογενή επίπεδα των Hey1 και Hey2 mRNA αυξάνονται εντόνως, και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες συσσωρεύονται στον πυρήνα μετά από έκφραση του NICD σε διάφορους κυτταρικούς τύπους (C2C12, 10T1/2, 293T και U2OS, A10) (Iso et al 2001a, Iso et al 2003).

Αν και τα παραπάνω δεδομένα συνηγορούν στο ότι οι πρωτεΐνες Hey είναι πιθανοί στόχοι του Notch μονοπατιού, δεν αποδεικνύουν ότι ταυτόχρονα είναι άμεσοι ή/και φυσιολογικοί στόχοι του. Κατ' αρχήν, η έκφραση των Hey γονιδίων μπορεί να ρυθμίζεται θετικά δευτερευόντως, δηλαδή να είναι αποτέλεσμα της έκφρασης άλλων, ενδιάμεσων γονιδίων, η οποία προκαλείται

μετά από την υπερέκφραση του NICD. Άλλωστε, η υπερέκφραση και μόνο του NICD μπορεί να προκαλέσει φυσιολογικά πολύπλοκες κυτταρικές αντιδράσεις. Για την παράκαμψη των παραπάνω πιθανών προβλημάτων, εφαρμόστηκε μία διαφορετική τακτική, βασισμένη στην συγκαλλιέργεια δύο ομάδων κυττάρων, στη μία εκ των οποίων εκφράζονται ενδογενώς τρεις υποδοχείς Notch, οι Notch1-3 και στην άλλη εκφράζουν έναν από τους ακόλουθους δεσμευτές του, τον Jagged1 (L κύτταρα) ή τον Dll1 (QT6 κύτταρα). Η τακτική αυτή θεωρητικά αντιπροσωπεύει πιστότερα την πραγματική ενεργοποίηση του μονοπατιού. Υπό αυτές τις συνθήκες, και παρουσία κυκλοεξαμιδίου, το οποίο παρεμποδίζει την de novo σύνθεση πρωτεϊνών (και γι' αυτό εκμηδενίζει οποιαδήποτε δευτερογενή αποτελέσματα που μπορεί να προκαλούνται από την ενεργοποίηση του μονοπατιού) εκτιμήθηκε ότι αυξάνονται δραματικά τα ενδογενή επίπεδα mRNA των Hey1 (Iso et al 2001a, Iso et al 2002) και Hey2 (Iso et al 2002), αποδεικνύοντας ότι είναι πιθανότατα πρωταρχικοί στόχοι του Notch μονοπατιού.

Η ενεργοποίηση της έκφρασης των Hey γονιδίων από το Notch μονοπάτι είναι εξαρτώμενη από την πρωτεΐνη RBP-JK, ομόλογη της πρωτεΐνης Su(H) στα θηλαστικά (Iso et al 2001a). Η κυριότερη απόδειξη για τον κρίσιμο ρόλο της RBP-JK στην ενεργοποίηση των Hey γονιδίων είναι ότι σε OT11 κύτταρα, που στερούνται αυτής της πρωτεΐνης, καθώς προέρχονται από ομόζυγα RBP-Jk^{-/-} ποντίκια, τα επίπεδα mRNA των Hey1 και Hey2 δεν αυξάνονται μετά από παροδική διαμόλυνση με ανασυνδυασμένο αδενοϊκό φορέα έκφρασης του NICD ή συγκαλλιέργεια με L ή QT6 κύτταρα. Στις παραπάνω συνθήκες, η επαγωγή της έκφρασης των Hey1 και Hey2 γονιδίων επιτυγχάνεται, εάν απλά τα OT11 κύτταρα διαμολυνθούν με πλασμίδια έκφρασης της RBPJk (Iso et al 2001a, Iso et al 2002).

Παρόμοια συμπεράσματα με τα προαναφερθέντα προκύπτουν από την ανάλυση του προτύπου έκφρασης των γονιδίων Hey in vivo μετά από επαγωγή της σηματοδότησης Notch. Οι Lin et al (2000) έδειξαν ότι η πρωτεΐνη Hey3 επάγεται μετά από υπερέκφραση του NotchΔΕ, μιας μορφής του Notch1 υποδοχέα, από την οποία λείπει το εξωκυττάριο τμήμα της πρωτεΐνης, καθιστάμενη με αυτόν το τρόπο διαρκώς ενεργή, κατ' αναλογία με το NICD. Αντίθετη πειραματική προσέγγιση συνιστά η εξέταση του προτύπου έκφρασης των διάφορων γονιδίων Hey σε ποντίκια μεταλλαγμένα για συστατικά του Notch μονοπατιού, η οποία οδηγεί στα ίδια με τα παραπάνω συμπεράσματα. Μετάλλαξη του γονιδίου *Notch1* σε ποντίκια έχει ως αποτέλεσμα την ιδιαίτερα μειωμένη και αποδιοργανωμένη έκφραση των γονιδίων *Hey1-3* στο προσωμιακό μεσόδερμα και τους σωμίτες (Leimeister et al 2000α, β) knock out του γονιδίου *Dll1*, που κωδικοποιεί για έναν από τους δεσμευτές του Notch μονοπατιού, προκαλεί επίσης ελάττωση, καθώς και διατάραξη του κανονικού προτύπου έκφρασης των γονιδίων *Hey1-3* στο προσωμιακό και σωμιακό μεσόδερμα (Kokubo et al 1999, Leimeister et al 2000α,β). Επίσης, μετάλλαξη του

γονιδίου *Dll3*, οδηγεί σε ουσιαστική εκμηδένιση της πρωτεΐνης Hey1 στο προσωμιακό μεσόδερμα (Dunwoodie et al 2002). Τέλος, σημαντικότερη ένδειξη για τη λειτουργία των Hey γονιδίων ως διεκπεραιωτές του Notch μονοπατιού αποτελεί η ομοιότητα του φαινοτύπου των Hey2^{-/-} ποντικών στην ανάπτυξη της καρδιάς (Donovan et al 2002, Gessler et al 2002, Sakata et al 2002), ο οποίος μοιάζει πολύ με το φαινότυπο που προκαλείται από έλλειψη λειτουργίας JAG1 ή ακόμα και απλοανεπάρκεια του JAG1 ή σε διπλά ετερόζυγη κατάσταση για τα γονίδια Notch2 και JAG1 (Donovan et al 2002).

Τέλος, το ίδιο το πρότυπο έκφρασης των Hey γονιδίων σε διάφορους ιστούς αγρίου τύπου σε σύγκριση με αυτό διαφόρων συστατικών του Notch μονοπατιού μπορεί να θεωρηθεί σε αρκετές περιπτώσεις ως σοβαρή ένδειξη υπέρ της θεωρίας ότι οι Hey πρωτεΐνες είναι άμεσοι και φυσιολογικοί στόχοι του Notch μονοπατιού. Για παράδειγμα, οι Leimeister et al (2000β) αναφέρουν ότι γονίδιο *Hey3* είναι πολύ πιθανός μεταγραφικός στόχος του *Notch3*, βασιζόμενοι στην ανάλυση της δραστηριότητας του υποκινητή του (Maier and Gessler 2000) αλλά και στο γεγονός ότι το πρότυπο έκφρασης των δύο γονιδίων συμπίπτει στα λεία μυϊκά κύτταρα της πεπτικής οδού και του αγγειακού συστήματος, καθώς και στα όψιμα στάδια της ανάπτυξης του θύμου αδένου. Η συνέκφραση Hey πρωτεϊνών και του υποδοχέα Notch5 έχει επίσης παρατηρηθεί στο zebrafish στη ραχιαία αορτή (Lawson et al 2001). Στον Xenopus το πρότυπο έκφρασης του X-Hey1 αλληλοεπικαλύπτεται σε μεγάλο βαθμό με το πρότυπο έκφρασης του Notch-1, Delta-1 και Serrate-1 στον πρόνεφρο αλλά και στο γραμμικό καρδιακό σωλήνα, υποδηλώνοντας με αυτόν τον τρόπο ότι και σε αυτό τον οργανισμό το X-Hey1 μπορεί να φέρνει εις πέρας το σήμα Notch είτε για την καταστολή της διαφοροποίησης του αγωγού είτε για τον καθορισμό προτύπου της καρδιάς (Rones et al 2002).

Υπάρχουν ωστόσο και μελέτες που οδηγούν σε (μερικώς) αντιτιθέμενα συμπεράσματα για το ρόλο των γονιδίων Hey ως στόχων και διακπεραιωτών του μονοπατιού Notch. Στο zebrafish το Notch σηματοδοτικό μονοπάτι εμπλέκεται (μεταξύ άλλων και) στην αγγειογένεση, παρεμποδίζοντας την υιοθέτηση της «φλεβικής» αναπτυξιακής τύχης έναντι της «αρτηριακής», χωρίς όμως να προάγει την τελευταία (Lawson et al 2001). Ισχύει ότι ένεση NICD σε έμβρυα zebrafish ενεργοποιεί την έκφραση του ενδογενούς *Hey2 (gridlock)* επεκτείνοντας το πρότυπο έκφρασής του στο προσωμιακό μεσόδερμα (Zhong et al 2001), όπως άλλωστε και σε άλλους ιστούς (π.χ. στον πρόσθιο εγκέφαλο) σε μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια (Lawson et al 2001). Η επαγωγή της έκφρασης πραγματοποιείται κατά τρόπο εξαρτώμενο από *Su(H) (RBPJK)*, καθώς ένεση της υπερέχουσας αρνητικής μορφής του μορίου *Su(H)* μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του *Hey2* στο πλευρικό μεσόδερμα (Zhong et al 2001). Επίσης, μετά από μελέτες βασισμένες στην υπερέκφραση του γονιδίου ή αντικωδικού mRNA και την επακόλουθη εξέταση

κατάλληλων γονιδίων δεικτών φλεβών και αρτηριών διατυπώθηκε το συμπέρασμα ότι το *gridlock* είναι στόχος και διακπεραιωτής του μονοπατιού στην παρέμποδιση ανάπτυξης των φλεβών. Ωστόσο, τελικά αποδείχτηκε ότι ειδικά στη ραχιαία αορτή, το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου παραμένει αναλλοίωτο όταν αδρανοποιείται η σηματοδότηση Notch, αν και συνεπάγεται τους αναμενόμενους φαινότυπους του καμπυλωμένου κορμού, της διαστρεβλωμένης νωτοχορδής και του μη κανονικού προτύπου του αγγειακού συστήματος, καθώς και τη μη κανονική, επεκτεταμένη στη ραχιαία αορτή έκφραση των *flt4* και *rtk5* γονιδίων, δεικτών για φλέβες, και την αντίστοιχη μείωση της έκφρασης του *ephrinB2* γονιδίου, δείκτη αρτηριών (Lawson et al 2001). Οι διαφορές των παραπάνω ερευνητικών ομάδων θα μπορούσαν να έγκεινται στο ότι οι μεν εξέτασαν το πρότυπο έκφρασης του *Hey2* σε διαφορετικό ιστό και σε διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο απ' ό,τι οι δε (προσωμικό μεσόδερμα, αρχικά αναπτυξιακά στάδια, Zhong et al 2001 - ραχιαία αορτή, μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια ενεμένων εμβρύων, Lawson et al 2001). Η συνέκφραση του *Hey2* με τον φλεβικό δείκτη *flt4* σε πρώιμα στάδια της αγγειογένεσης (Zhong et al 2001, Lawson et al 2002), η προαναφερθείσα αναλλοίωτη έκφρασή του σε γενετικό υπόστρωμα έλλειψης λειτουργίας του Notch μονοπατιού, όπως επίσης και το γεγονός ότι η έκφραση των γονιδίων *efnB2* (δείκτης για αρτηρίες) και *flt4* (δείκτης για φλέβες) παραμένει ανεπηρέαστη στο μεταλλαγμένο για το γονίδιο *gridlock* στέλεχος (από Lawson et al 2001, 2002), είναι ισχυρές ενδείξεις για τη μη συμμετοχή του στο μονοπάτι του Notch στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης των φλεβών αλλά στη συμμετοχή του στο σχηματισμό της ραχιαίας αορτής.

Στα έμβρυα *Xenopus* ενέσεις με NICD ή ενεργό Su(H) αυξάνει την έκφραση του ενδογενούς *Hey1* στο κεφάλι και στους σωματίτες, αλλά ποτέ δεν παρατηρείται εκτοπική έκφραση. Αντιστρόφως, ενέσεις υπερέχουσας αρνητικής μεταλλαγής του Su(H) γονιδίου καταστέλλουν την έκφρασή του (Rones et al 2002). Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι στο *Xenopus* η απόκριση του γονιδίου στη σηματοδότηση μέσω Notch διαφέρει σε σχέση με τις παραπάνω παρατηρήσεις, όταν ο εξεταζόμενος ιστός είναι το αναπτυσσόμενο νεφρό. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το γονίδιο ενεργοποιείται μετά από ενέσεις με NICD ή ενεργό Su(H) μόνο κατά τα μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια, ενώ καταστέλλεται όταν η σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού πραγματοποιηθεί σε πιο πρώιμα στάδια, πιθανότατα λόγω της συνεπαγόμενης γενικότερης παρεμπόδισης της διαφοροποίησης (Rones et al 2002).

2.6 Πρότυπο έκφρασης των πρωτεϊνών Hey και ο αναπτυξιακός τους ρόλος.

Αν και έχει ταυτοποιηθεί ηλεκτρονικά η ύπαρξη ορθόλογου γονιδίου Hey στη *Drosophila*, οι μελέτες έχουν περιοριστεί μόνο σε σπονδυλωτά, από τις οποίες προκύπτει ότι το πρότυπο έκφρασης των διάφορων Hey αποδεικνύεται ως αρκετά δυναμικό κατά την ανάπτυξη του οργανισμού και ιδιαίτερα εκτεταμένο σε διάφορους ιστούς. Άλλωστε, όπως προαναφέρθηκε, τείνει να αλληλοεπικαλύπτεται με το πρότυπο έκφρασης διαφόρων συστατικών του Notch μονοπατιού, αποκαλύπτοντας έτσι πιθανές νέες λειτουργίες του, όπως για παράδειγμα στην ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος. Ακολουθεί πιο αναλυτική περιγραφή του προτύπου έκφρασης των γονιδίων σε ποντίκια και ο πιθανός ρόλος τους σε συγκεκριμένες αναπτυξιακές διαδικασίες.

Σε ιστούς ενήλικων ποντικών τα γονίδια Hey1-3 εκφράζονται ευρέως σύμφωνα με ανάλυση κατά Northern. Μετάγραφα του Hey1 ανιχνεύθηκαν στην καρδιά, τον εγκέφαλο και τους πνεύμονες. Το γονίδιο Hey2 εκφράζεται έντονα στην καρδιά, αλλά ανιχνεύθηκε και στον εγκέφαλο, στους πνεύμονες και στα νεφρά. Το Hey3 εκφράζεται έντονα στην καρδιά και λιγότερο στα νεφρά και στους πνεύμονες (Nakagawa et al 1999, Steidl et al 2000).

Το πρότυπο έκφρασης των Hey γονιδίων κατά τη εμβρυική ανάπτυξη του ποντικού αποδεικνύεται όχι μόνο πολύπλοκο και δυναμικό αλλά παρουσιάζει σε ορισμένες περιπτώσεις ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό, το οποίο είναι η συμπληρωματική έκφραση των μελών της οικογένειας. Γενικότερα, στην E9.5 μέρα της ανάπτυξης τα κυρίαρχα σημεία έκφρασης των γονιδίων είναι σε πρόδρομες δομές του καρδιαγγειακού συστήματος, των σωματιών, και των φαρυγγικών τόξων, ενώ αργότερα κατά την οργανογένεση εκφράζονται στο μεσέγγυμα του άπω άκρου στις πρόδρομες δομές των μελών, στο νευρικό σύστημα, στους οστεοβλάστες, στο θύμο αδένα και στο νεφρό (Kokubo et al 1999, Nakagawa et al 1999).

2.6.1 Πρωτεΐνες Hey και σωματογένεση.

Οι σωμίτες εμφανίζονται ως επιθηλιακά τμήματα σφαιρικού σχήματος, διάταξης ευθείας επανάληψης (σειράς) και με περιοδικό τρόπο από ένα μεσεγγυματικό, μη μεταμερισμένο ιστό, επονομαζόμενο προσωμιτικό μεσόδερμα. Από τους σωμίτες δημιουργούνται οι σκελετικοί μύες, ο αξονικός σκελετός και η δερμίδα της ράχης.

Πιο αναλυτικά, σύμφωνα με τα αποτελέσματα πειραμάτων *in situ* υβριδισμού σε έμβρυα ποντικού, η έκφραση του γονιδίου Hey1 ανιχνεύεται για πρώτη φορά στην E8.5 μέρα της εμβρυογένεσης στο προσωμιτικό μεσόδερμα. Στην E9.5 μέρα της εμβρυογένεσης, τα επίπεδα

έκφρασης του γονιδίου αυξάνονται στο προσωμικό μεσόδερμα και επιπλέον, ανιχνεύεται έκφρασή του στο οπίσθιο μέρος των νεοσχηματιζόμενων σωματιών. Τα μετάγραφα του Hey1 παραμένουν υψηλά και με το ίδιο πρότυπο μέχρι και 10.5 μέρες μετά την έναρξη της εμβρυογένεσης. Με την ωρίμανση των σωματιών μειώνεται και η έκφραση του Hey1. Τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, Hey2 και Hey3, επίσης εκφράζονται στο προσωμικό μεσόδερμα και στους σωματίτες. Η έκφραση του Hey2 είναι πάντως πιο αδύνατη, αν και φαίνεται να είναι πιο εκτεταμένη προς το οπίσθιο μέρος του προσωμικού μεσοδέρματος, συγκριτικά με την έκφραση του Hey1, που περιορίζεται προς το εμπρόσθιο τμήμα (Kokubo et al 1999, Nakagawa et al 1999, Leimeister et al 1999, Leimeister 2000α, Leimeister 2000β, Dunwoodie et al 2002).

2.6.2 Πρωτεΐνες Hey και νευρογένεση.

Το γονίδιο Hey1 εκφράζεται στο κοιλιακό επίπεδο του νευρικού σωλήνα και στα τελεγκεφαλικά κυστίδια (Leimeister et al 1999, Kokubo et al 1999, Nakagawa et al 1999). Η έκφρασή του περιορίζεται κατά την πρόοδο της ανάπτυξης στη κοιλιακή στοιβάδα του τελεγκεφάλου και στα τελεγκεφαλικά κυστίδια (Leimeister et al 1999, Kokubo et al 1999). Ανιχνεύεται επίσης στην κοιλιακή περιοχή του μεσεγκεφάλου και στον οπισθεγέφαλο (Kokubo et al 1999). Αργότερα κατά την ανάπτυξη εκφράζεται στην εξώτερη στοιβάδα της παρεγκεφαλίδας, απ'όπου θα προκύψουν νύρα και γλοία (Leimeister et al 1999, Kokubo et al 1999). Αντίθετα, τα γονίδια Hey2 και Hey3 εκφράζονται στο μεσέγχυμα που περιβάλλει το νευρικό σωλήνα στην E10.5 μέρα της εμβρυϊκής ανάπτυξης (Nakagawa et al 1999). Το γονίδιο Hey2 επίσης ανιχνεύεται στα χορδικά νύρα, κρανιακά γάγγλια, στον τελεγκεφαλο και στο όριο μεταξύ του μεσεγκεφάλου και οπισθεγέφαλου (Leimeister et al 1999). Αργότερα, το Hey2 εκφράζεται εντόνως στην εξώτερη στοιβάδα του εγκεφαλικού φλοιού (Leimeister et al 1999).

Σημαντική διαφορά στο πρότυπο έκφρασης των Hey1 και Hey2 υπάρχει στο οσφρητικό επιθήλιο. Η έκφραση του Hey1 παρατηρείται από πολύ νωρίς στα εγκολπούμενα οσφρητικά πλακώδια και παραμένει έντονη σε μετέπειτα στάδια της ανάπτυξης στο οσφρητικό επιθήλιο και σε μικρότερο βαθμό στο περιβάλλον μεσέγχυμα (Kokubo et al 1999, Leimeister 1999). Αντίθετα, το Hey2 εκφράζεται μόνο σε όψιμα αναπτυξιακά στάδια στο διαφοροποιημένο αισθητικό επιθήλιο. Πιο λεπτομερώς, το Hey2 εκφράζεται στην ενδιάμεσο πληθυσμό μετα-μιτωτικών οσφρητικών νευρώνων, σε αντίθεση με το Hey1 που εντοπίζεται στη κορυφαία κυτταρική στοιβάδα μη νευρικών επικουρικών κυττάρων.

2.6.3 Πρωτεΐνες Hey και γλοιογένεση.

Πειράματα *in situ* υβριδισμού έδειξαν ότι όλα τα Hey γονίδια εκφράζονται στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του ποντικού, ένα εξαιρετικό μοντέλο για την ανάλυση παραγόντων που ρυθμίζουν τη νευρογένεση (Leimeister et al 1999, Satow et al 2001). Όλα τα Hey γονίδια εκφράζονται στη ζώνη που περιέχονται τα από κοινού πρόδρομα για νευρώνες και γλοία κύτταρα. Τα γονίδια *Hey1* και *Hey3* εκφράζονται στη γαγγλιακή κυτταρική στοιβάδα. Το γονίδιο *Hey1* εκφράζεται αργότερα κατά την ανάπτυξη στην εξωτερική και εσωτερική περιοχή της εσώτερης πυρηνικής στοιβάδας, ενώ το γονίδιο *Hey2* εκφράζεται στη μέση περιοχή της εσώτερης πυρηνικής στοιβάδας του αμφιβληστροειδούς, η οποία εν γένει συμπεριλαμβάνει τρεις διαφορετικούς τύπους νευρώνων και ένα τύπο κυττάρων γλοίας (Müller γλοία). Το πρότυπο έκφρασης της *Hey2* είναι εξαρτώμενο από τη δράση των γονιδίων *Mash1* και *Math3*, γνωστών γονιδίων νευρικού καθορισμού, αφού ταυτόχρονες μεταλλαγές έλλειψης λειτουργίας συνεπάγονται αύξηση των επιπέδων έκφρασης της *Hey2* και αύξηση του αριθμού των κυττάρων γλοίας στο συγκεκριμένο ιστό. Αναλόγως, ρετροϊκή έκφραση της *Hey2*, αλλά όχι της *Hey1* ή της *Hey3*, στο συγκεκριμένο ιστό προάγει τη γλοιογένεση και αναστέλλει τη νευρογένεση, σε αντίθεση μάλιστα με τα αποτελέσματα που επιφέρει η ρετροϊκή έκφραση της *Hey3*, η οποία προάγει τη διαφοροποίηση περισσότερων ραβδίων-φωτουποδοχέων (Satow et al 2001).

2.6.4 Πρωτεΐνες Hey και ανάπτυξη του καρδιαγγειακού συστήματος.

Σε πολύ πρώιμο στάδιο της ανάπτυξης του ποντικού, προκαρδιακά μεσοδερμικής προέλευσης κύτταρα προορίζονται για το σχηματισμό είτε κολπικών είτε κοιλιακών κυττάρων, με τα τελευταία τοποθετημένα προσθίως των πρώτων. Ο πρώιμος αναπτυξιακά καρδιακός σωλήνας διατηρεί το μεταμερισμένο αυτό πρότυπο (κοιλιακά πρόδρομα κύτταρα προσθίως-κολπικά πρόδρομα κύτταρα οπισθίως). Τα *Hey1* και *Hey2* γονίδια εκφράζονται αντιστοίχως στα κολπικά και στα κοιλιακά πρόδρομα κύτταρα καθ'όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης της καρδιάς, η δε αμοιβαία αποκλειστική έκφρασή τους διατηρείται στις αντίστοιχες δομές, κόλπους και κοιλίες, και αργότερα κατά την ανάπτυξη (Kokubo et al 1999, Nakagawa et al 1999). Το *Hey3* γονίδιο, αν και εκφράζεται στην καρδιά του ενήλικου ατόμου, δεν εκφράζεται κατά την ανάπτυξη (Nakagawa et al 1999).

Σε υψηλά επίπεδα έχουν ανιχνευθεί τα mRNA τόσο του *Hey1* όσο και του *Hey2* γονιδίου στη ραχιαία αορτή (Nakagawa et al 1999, Chin et al 2000, Iso et al μη δημοσιευμένες παρατηρήσεις), στο αορτικό τόξο και στον αορτικό σάκκο (Kokubo et al 1999, Nakagawa et al 1999). Το γονίδιο *Hey3* εκφράζεται μόνο στην ραχιαία αορτή, όπου εντείνεται η έκφρασή του κατά την πρόοδο της ανάπτυξης, και στην πνευμονική αρτηρία σε μετέπειτα στάδια (Nakagawa et

al 1999). Τέλος, η Hey2 πρωτεΐνη επάγεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα κατά τη διαδικασία σχηματισμού σωλήνων ενδοθηλιακών κυττάρων, μία καλά χαρακτηρισμένη διαδικασία αγγειογένεσης. Πειράματα κέρδους και έλλειψης λειτουργίας έδειξαν ότι η Hey2 εμπλέκεται στο σχηματισμό δικτύου από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Henderson et al 2001).

Ο κυρίαρχος ρόλος των Hey γονιδίων στην ανάπτυξη του καρδιαγγειακού συστήματος επιβεβαιώθηκε πρόσφατα από τις μελέτες τριών ανεξάρτητων ερευνητικών ομάδων σε ποντίκια με μεταλλαγές πλήρους έλλειψης λειτουργίας για το γονίδιο Hey2 (Donovan et al 2002, Gessler et al 2002, Sakata et al 2002). Αν και οι φαινότυποι που παρατηρήθηκαν διέφεραν ελαφρώς μεταξύ τους, ίσως λόγω των διαφορετικών γενετικών υποστρωμάτων των μεταλλαγμένων στελεχών, το κύριο συμπέρασμα είναι ότι η μετάλλαξη του γονιδίου συνεπάγεται καρδιομυοπάθεια και κρίσιμες διαταραχές, με πλειοτροπικά μάλιστα αποτελέσματα, στην ανάπτυξη της καρδιάς. Η προκαλούμενη καρδιομυοπάθεια επιφέρει το θάνατο σε ένα μεγάλο ποσοστό των ομόζυγων για τη μετάλλαξη ατόμων κατά τη διάρκεια των πρώτων δέκα ημερών μετά τη γέννησή τους. Η μη απόλυτη διεισδυτικότητα του φαινοτύπου οφείλεται πιθανότατα στο γενετικό υπόστρωμα των ES κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των μεταλλαγμένων στελεχών. Αξιοσημείωτη είναι η διαφορά μεταξύ των φαινοτύπων έλλειψης λειτουργίας του Hey2 γονιδίου στο zebrafish και στον ποντικό. Υπενθυμίζοντας ότι η έλλειψη λειτουργίας του Hey2 στο zebrafish προκαλεί την παύση της κυκλοφορίας στο οπίσθιο τμήμα της ραχιαίας αορτής λόγω δομικής παραμόρφωσής της, πρέπει να αναφερθεί ότι η αντίστοιχη μετάλλαξη στον ποντικό δεν επηρεάζει καθόλου αυτή την πλευρά του καρδιαγγειακού συστήματος. Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στην πιθανώς διαφορετική λειτουργία του γονιδίου μεταξύ των δύο ειδών (Donovan et al 2002, Gessler et al 2002). Εξίσου πιθανό είναι πάντως και η διαφορά να οφείλεται στο ότι η απομονωμένη μεταλλαγή στο zebrafish έχει χαρακτηριστεί υπομορφική, ενώ στα ποντίκια είναι μάλλον αμορφική (Donovan et al 2002). Πρέπει επίσης να δοθεί έμφαση στο γεγονός ότι οι παραπάνω μεταλλαγές δεν είχαν κανένα αποτέλεσμα στη σωματογένεση ή την ανάπτυξη του αμφιβληστροειδούς, γεγονός που υπογραμμίζει την ύπαρξη των άλλων δύο μελών της γονιδιακής αυτής οικογένειας και τη πιθανή εξισωτική-πλεονάζουσα δράση τους.

Συλλογικά, τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι οι Hey πρωτεΐνες κατέχουν πολλαπλό ρόλο κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης, συμπεριλαμβανομένου της διαφοροποίησης λείων μυικών κυττάρων, αγγειογενετικών διαδικασιών, καθορισμού της κυτταρικής μοίρας μεταξύ φλεβών και αρτηριών και αγγειακής μορφογένεσης. Είναι αξιοσημείωτο ότι υπάρχουν όλο και αυξανόμενες αποδείξεις για τη σημασία του Notch μονοπατιού στην ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος (από Iso et al 2003). Είναι για

παράδειγμα πολύ ενδιαφέρον το γεγονός ότι knock out του *Notch1* στα ποντίκια έχει ως αποτέλεσμα διαταραχές στην ανάπτυξη του εμβρυικού αγγειακού συστήματος (Krebs et al 2000). Δεδομένου ότι δεν παρατηρείται έκφραση των Hes γονιδίων στο αγγειακό σύστημα, οι Hey πρωτεΐνες ίσως αποτελούν τους πιο πιθανούς διεκπεραιωτές του Notch μονοπατιού στο συγκεκριμένο σύστημα (Iso et al 2003).

2.6.5 Πρωτεΐνες Hey και μυογένεση.

Οι Nakagawa et al (1999) ανίχνευσαν mRNA του *Hey2* γονιδίου στο δερμομυοτόμο του σωμίτη 10.5 μέρες μετά την έναρξη της εμβρυογένεσης. Αντίθετα, το γονίδιο *Hey2* και *Hey3* εκφράζονται σε διακριτά σημεία στους σωμίτες την ίδια χρονική στιγμή. Το γονίδιο *Hey2* εκφράζεται μόνο στο παραξονικό μεσόδερμα, αλλά ποτέ στο δερμομυοτόμο ή το σκληροτόμο, ενώ το γονίδιο *Hey3* εκφράζεται στο παραξονικό μεσόδερμα και το σκληροτόμο.

Επίσης, έχει ανιχνευθεί το mRNA του *Hey3* γονιδίου στη στοιβάδα των λείων μυών της αορτής στο έμβρυο του ποντικού (Leimeister et al. 2000a). Έκφραση του ποντικίσιου *Hey2* παρατηρείται κατά τη διαφοροποίηση των προερχόμενων από τη νευρική ακρολοφία *Monc1* κυττάρων σε αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα (Chin et al 2000).

Έχει ήδη αναφερθεί ότι τα γονίδια *Hey1* και *Hey2* επάγονται μετά από σηματοδότηση Notch σε αορτικά λεία μυϊκά κύτταρα A10, στα οποία όμως εκφράζονται και ενδογενώς (Iso et al 2002). Επιπλέον ενδείξεις σχετικά με το ότι οι Hey πρωτεΐνες μπορεί να εμπλέκονται στη μυογένεση προκύπτουν από πειράματα σε C2C12 μυοβλάστες. Οι Iso et al (2001a) έδειξαν ότι σηματοδότηση Notch αυξάνει τα ενδογενή επίπεδα του *Hey1* mRNA δραματικά. Ακόμα πιο σημαντικά φαίνονται τα αποτελέσματα των Sun et al (2001), σύμφωνα με τα οποία τα (ήδη υψηλά) ενδογενή επίπεδα του *Hey1* mRNA σε αδιαφοροποίητα μυοβλαστικά κύτταρα C2C12 μειώνονται καθώς εξελίσσεται η διαφοροποίησή τους. Οι συγγραφείς υποθέτουν ότι το *Hey1* γονίδιο έχει ρόλο αρνητικού ρυθμιστή της μυϊκής διαφοροποίησης.

2.6.6 Πρότυπο έκφρασης σε άλλα σπονδυλωτά.

Στα άλλα σπονδυλωτά όπου έχει μελετηθεί το πρότυπο έκφρασης και ο ρόλος Hey πρωτεϊνών, φαίνεται να υπάρχουν αρκετές ομοιότητες με ότι έχει γίνει γνωστό από τα ποντίκια. Οι Zhong et al (2000) αναφέρουν ότι το γονίδιο *Hey2* αρχίζει να εκφράζεται σε ζώνες του μεσοδέρματος σε πολύ πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο, ενώ αργότερα εκφράζεται στη ραχιαία αορτή. Επιπρόσθετα, εκφράζεται στη καρδιά, αορτικά τόξα και στους πλευρικούς σωμίτες (Zhong et al 2000).

Όσον αφορά το πρότυπο έκφρασης στο *Xenopus*, αυτό ανιχνεύεται στον εγκέφαλο, στους οφθαλμούς, στους σωματίες και στα βραγχιακά τόξα. Έχει ήδη αναφερθεί, ότι συνεκφράζεται με τον υποδοχέα Notch και το δεσμευτές Delta και Serrate στον πρόνεφρο και στον καρδιακό σωλήνα (Rones et al 2002).

Στο κοτόπουλο, τα γονίδια *c-Hey1* και *c-Hey2* εκφράζονται στο οπίσθιο τμήμα των σωματιών και το προσωμιτικό μεσόδερμα. Το *c-Hey1* εκφράζεται μόνο στο πρόσθιο τμήμα του προσωμιτικού μεσοδέρματος, ενώ το *c-Hey2* εκφράζεται σε όλη την έκτασή του. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι το *c-Hey2* συνεκφράζεται μαζί με το *c-hairy1*, όχι μόνο τοπικά αλλά και περιοδικά κια ανεξάρτητα πρωτεϊνοσύνθεσης, υποδεικνύοντας έτσι παρόμοιο τρόπο ρύθμισης και αναπτυξιακό ρόλο στον καθορισμό των σωματιών. Και τα δύο *Hey* γονίδια εκφράζονται με το *c-hairy1* στο οπίσθιο τμήμα των σωματιών.

2.7 Λειτουργική σχέση των πρωτεϊνών Hey και Hes.

Η συνέκφραση των *Hey* και *Hairy/Hes* γονιδίων στο προσωμιτικό μεσόδερμα και στους σωματίες στο κοτόπουλο και στα θηλαστικά, αλλά και σε άλλους ιστούς βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων (αν και δεν είναι γνωστό κατά πόσο συνεκφράζονται και στους ίδιους κυτταρικούς τύπους τού ίδιου ιστού) (Iso et al 2003) και εφόσον τα μέλη και των δύο πρωτεϊνικών οικογενειών είναι ως επί το πλείστον στόχοι του ίδιου μονοπατιού, του Notch μονοπατιού, γεννάται το ερώτημα εάν η συνέκφρασή τους κρύβει κάποια ιδιαίτερη σημασία.

Μία πιθανότητα είναι ότι τα ενδογενή επίπεδα της κάθε μιας πρωτεΐνης κρίνει ποια θα διεκπεραιώσει τη σηματοδότηση Notch. Επίσης, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, καθώς και διαπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να ρυθμίσουν τη συγγένεια πρόσδεσης είτε των Hes είτε των Hey ομοδιμερών και κατ' επέκταση να καθορίσουν την έκβαση του μονοπατιού. Για παράδειγμα, φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Hes1 σε συγκεκριμένα αμινοξέα της έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια ικανότητας πρόσδεσης στο DNA. Αφού αυτά τα αμινοξέα δεν είναι παρόντα στις πρωτεΐνες Hey, μία πιθανή φωσφορυλίωση της Hes1 θα μπορούσε να ευνοήσει την πρόσδεση ομοδιμερών Hey πρωτεϊνών και άρα την διαφορική έκβαση του μονοπατιού. Εναλλακτικά, μία τρίτη πιθανότητα είναι να αλληλεπιδρούν Hey και Hes πρωτεΐνες προς σχηματισμό ετεροδιμερών, επιτυγχάνοντας ίσως συνεργατική πρόσδεση στο DNA.

Η τελευταία υπόθεση υποστηρίζεται από πειραματικά δεδομένα που αποδεικνύουν ότι οι πρωτεΐνες Hes και Hey αλληλεπιδρούν *in vitro* αλλά και *in vivo* είτε με τη μέθοδο των δύο υβριδίων είτε σε εκχυλίσματα κυτάρων, παροδικά διαμολυσμένων με πλασμίδια έκφρασης για τις εν λόγω πρωτεΐνες (Leimeister et al 2000, Iso et al 2001β). Επιπλέον, ετεροδιμερή Herp-Hes πρωτεϊνών προσδένονται αποτελεσματικότερα σε αλληλουχίες τάξης C συγκριτικά με τα

αντίστοιχα ομοδιμερή (Iso et al 2001β). Ταυτόχρονα, φαίνεται ότι ο σχηματισμός ετεροδιμερών οδηγεί σε ενισχυμένη καταστολή γονιδίων αναφοράς, των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται μεταξύ άλλων και από συνθετικούς ενισχυτές-πολυμερή αλληλουχιών τάξης C, σε συγκριση με την καταστολή που επιτυγχάνεται από αντίστοιχα ομοδιμερή (Iso et al 2001β). Είναι πιθανό η συνεργατική κατασταλτική δραστηριότητα των ετεροδιμερών να προκαλείται τόσο από την συνεργατική πρόσδεση των ετεροδιμερών στο DNA όσο και από τους διαφορετικούς μηχανισμούς καταστολής που επιστρατεύει η κάθε μία πρωτεΐνη του ετεροδιμερούς.

Πάντως, εάν ο σχηματισμός ετεροδιμερών συμβαίνει φυσιολογικά σε κύτταρα, όπου συνεκφράζονται μέλη των δύο αυτών πρωτεϊνικών οικογενειών, θα μπορούσε να υποθεθεί ότι εξυπηρετεί την ενίσχυση του σήματος Notch μέσω αποτελεσματικότερης ρύθμισης γονιδίων στόχων.

2.8 Γονίδια στόχοι των Hey πρωτεϊνών.

Ένας μεταγραφικός στόχος των πρωτεϊνών Hey που έχει ταυτοποιηθεί μέχρι στιγμής είναι το εαυτό γονίδιο *Hey2*, εμπλεκόμενο με αυτόν τον τρόπο σε ένα μηχανισμό αρνητικής αυτοτροφοδότησης (Nakagawa et al 2000). Αξιοσημείωτο είναι ότι στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, το μικρότερο τμήμα του υποκινητή του *Hey2* γονιδίου που ανταποκρίνεται στην αρνητική ρύθμιση από τη πρωτεΐνη Hey2 δεν περιέχει προφανείς θέσεις πρόσδεσής της οποιουδήποτε τύπου (Nakagawa et al 2000). Επιπρόσθετα, τα αμοιβαία αποκλειόμενα πρότυπα έκφρασης των Hey1 και Hey2 ενισχύουν την υπόθεση ότι επιπλέον, υπάρχει ένας μηχανισμός αρνητικής αλληλορύθμισης.

Η ταυτοποίηση γονιδίων στόχων των πρωτεϊνών Hey και ιδιαίτερα των Hey/Hes ετεροδιμερών αναμένεται να αποκαλύψει σημαντικές πλευρές που αφορούν τόσο στην ειδικότητα της μεταγραφικής ρύθμισης αλλά και στη διαδικασία της ανάπτυξης και σχηματισμού πολύπλοκων δομών.

3 Στόχοι της εργασίας.

Η λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ E(spl) και προνευρικών πρωτεϊνών φαίνεται να παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στη ρύθμιση της υιοθέτησης της νευρικής αναπτυξιακής τύχης. Αν και η μεταξύ τους σχέση είναι αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια, υπάρχουν ακόμα αναπάντητα ερωτήματα τα οποία παρεμποδίζουν την απόκτηση πλήρους εικόνας σχετικά με τον ακριβή μηχανισμό της πλευρικής αναστολής.

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας έγινε προσπάθεια να διαλευκανθεί ο τρόπος δράσης των E(spl) πρωτεϊνών κατά την πλευρική αναστολή, ιδιαίτερα *in vivo*. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκε η συνεισφορά στη λειτουργία τους της ικανότητας πρόσδεσής τους στο DNA σε αντιπαράθεση με την πρόσδεσή τους σε προνευρικές πρωτεΐνες. Περαιτέρω αναλύθηκε η μοριακή βάση της λειτουργικής αλληλεπίδρασής τους με τα προϊόντα των προνευρικών γονιδίων.

Από την άλλη το γονίδιο *Hey* επιλέχθηκε ως ένα από συντηρημένο μέλος της οικογένειας των bHLH-Orange πρωτεϊνών, για το οποίο οι γνώσεις μας περιορίζονται σε μελέτες των ομολόγων του στα σπονδυλωτά. Ιδιαίτερη εντύπωση προκαλούν η εκτεταμένη σημασία των *Hey* γονιδίων σε μια πλειάδα αναπτυξιακών διαδικασιών, το ότι οι *Hey* πρωτεΐνες φαίνεται να είναι νέοι φυσιολογικοί στόχοι αλλά και διεκπεραιωτές του Notch μονοπατιού, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις αυτό αμφισβητείται έντονα και ταυτόχρονα, η ικανότητα να ετεροδιμερίζονται με τις *Hes* πρωτεΐνες *in vivo*, με συνέπεια τη συνεργατική πρόσδεση των ετεροδιμερών σε αντίστοιχες αλληλουχίες DNA, η οποία μπορεί να συνεπάγεται την αποτελεσματικότερη καταστολή κοινών γονιδίων στόχων.

Για τον αρχικό χαρακτηρισμό του γονιδίου *Hey* στη *Drosophila*, αρχικά εξετάστηκε το αναπτυξιακό πρότυπο έκφρασης του γονιδίου και έγιναν προκαταρκτικά πειράματα για το αν αποτελεί στόχο του μονοπατιού Notch.

4 Υλικά και Μέθοδοι:

4.1 Πλασμιδιακές κατασκευές, τεχνικές κλωνοποίησης και μέθοδοι χειρισμού DNA.

Όλες οι απαραίτητες ενζυμικές αντιδράσεις (PCR, κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης, πέψων με ενδονουκλεάση, τροποποίησης άκρων και σύνδεσης), οι πειραματικές διαδικασίες χειρισμού (μετασχηματισμού και καλλιέργειας) βακτηρίων (*E.coli* DH5α) και ανάκτησης σε μικρή ή μεσαία κλίμακα πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκαν βάσει γνωστών πρωτοκόλλων, προερχομένων είτε από Sambrook et al (1989) είτε από οδηγίες της εκάστοτε εταιρίας, (Nucleobond, NEB, Minotech Promega, Qiagen, Roche) σε περίπτωση χρήσης εμπορικού kit αντιδραστηρίων. Όλα τα πλασμίδια που φέραν ως ενθέματα προϊόντα PCR αντιδράσεων ή κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης υποβλήθησαν σε διαδικασία εύρεσης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing) για την επιβεβαίωση της ακεραιότητας της αλληλουχίας των ενθεμάτων ή της επίτευξης της επιθυμητής σημειακής μετάλλαξης.

4.2 Δημιουργία διαγενετικών στελεχών *Drosophila*.

Τα γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την υπερέκφραση πρωτεϊνών *in vivo* κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pUAST (Brand and Perrimon 1993). Τα πλασμίδια pUAST-E(spl)m7, pUAST-E(spl)mγ και pUAST-mδ περιγράφονται στους Ligoxygakis et al. (1999). Τα pUAST-E(spl)m7VP16 and pUAST-E(spl)m7KNEQVP16 έχουν περιγραφεί στην εργασία των Jiménez and Ish-Horowicz (1997). Το pUAST m7KNEQ προήλθε από την υποκλωνοποίηση του E(spl)m7KNEQ από το pUC - E(spl)m7KNEQ ως EcoRI/Sall σε EcoRI/Xho θέσεις. Το pUC - E(spl)m7KNEQ προέκυψε ταυτόχρονη κατευθυνόμενη σύνδεση του EcoRI/BamHI τμήματος E(spl)m7KNEQVP16 και του BamHI/Sall τμήματος του E(spl)m7 (το τελευταίο προερχόμενο από pBKSII E(spl)m7, όπου το cDNA του γονιδίου έχει κλωνοποιηθεί ως EcoRI/XhoI τμήμα) σε άκρα EcoRI/Sall του pUC. Το γονίδιο E(spl)mδVP16 απελευθερώθηκε από το πλασμίδιο pHK3N-E(spl)mδVP16 (προερχόμενο από S. Bray) ως BamHI-BglII τμήμα και κλωνοποιήθηκε στη θέση BglII του pUAST. Το γονίδιο E(spl)m7ΔW απελευθερώθηκε από τον πλασμιδιακό φορέα Ract ως EcoRI/PstI και υποκλωνοποιήθηκε στον φορέα pBKSII στις αντίστοιχες θέσεις. Στη συνέχεια υποκλωνοποιήθηκε στο pUAST ως EcoRI/XbaI. Τα γονίδια E(spl)bHLHVP16 και E(spl)OrangeVP16 προέκυψαν από τη σύνδεση του αμινοτελικού (αμινοξέα από 1-80) και τμήματος (αμινοξέα 81-186) τμήματος της E(spl)m7 με PCR αντίδραση. Στη συνέχεια υποκλωνοποιήθηκαν στον pBKSII ως EcoRI/BamHI οπότε μπόρεσαν να προσδεθούν στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο τα τμήματα VP16 ως BamHI. Αφού εξετάστηκε η

αλληλουχία τους για τυχόν μεταλλαγές, υποκλωνοποιήθηκαν στον pUAST ως EcoRI/XbaI. Τα γονίδια *Scute*₁₋₂₆₀ και *Scute*₁₋₂₉₀ απελευθερώθηκαν από το φορέα pJG4.5 που χρησιμοποιήθηκε για το σύστημα δύο υβριδίων ως EcoRI/XhoI τμήματα και κλωνοποιήθηκαν στις αντίστοιχες θέσεις του pUAST. Όλα τα διαγενετικά στελέχη δημιουργήθηκαν σε γενετικό υπόστρωμα *yw*^{67c23} με καθιερωμένες τεχνικές. Όλες οι διασταυρώσεις διατηρήθηκαν στους 25°C.

Για τα πειράματα υπερέκφρασης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής στελέχη: *omb-Gal4* (*P[Gal4]biomb-Gal4*), *pnr-Gal4* (*P[GawB]pnrMD237*), *ap-Gal4* (*P[GawB]apmd544*), που περιγράφονται στη FlyBase (www.flybase.org). Για τα πειράματα ανάλυσης μωσαικών ατόμων εφαρμόστηκε η ακόλουθη διαδικασία: Οι κλώνοι επήχθησαν με θερμικό σοκ των προνυμφών για 1 ώρα στους 38°C, 48-96 hours μετά την απόθεση εμβρύων (AEL) των γενοτύπων:

omb-GAL4/hs-FLP; EE4-lacZ/UAS-sc UAS-E(spl)m7; FRT82B hs-pMyc87E97E/FRT82B kar2 ry506 groE48

ή

hs-FLP/+; EE4-lacZ/+; FRT82B hs- pMyc87E97E/FRT82B kar2 ry506 P[gro+] Df(3R) grob32.2.

Σε όλα τα πειράματα επιλέχθησαν περιπλανώμενες προνύμφες 3^{ου} σταδίου. Στα πειράματα μωσαικής ανάλυσης οι προνύμφες υπέστησαν ξανά θερμικό σοκ για 90' στους 38°C για την επαγωγή της έκφρασης του pMyc και αφέθησαν να αναρρώσουν στους 25°C για 90' πριν τη διατομή τους.

4.3 Ιστοχημικές και ανοσοιστοχημικές χρώσεις σε έμβρυα και ιστούς *Drosophila*.

Για τα πειράματα ιστοχημικής ανίχνευσης δραστηριότητας β-γαλακτοσιδάσης, οι προνύμφες διατομήθηκαν σε 1x ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και στερεώθηκαν για 9' σε διάλυμα 1% γλουταραλδεΐδης / 1xPBS σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από εκεταμμένες πλύσεις των δειγμάτων οι προνύμφες τοποθετήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα χρώσης [10 mM Na-PO₄ buffer (pH 7.2), 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 3 mM K₄[Fe_{II}(CN)₆], 3 mM K₄[Fe_{III}(CN)₆], 0.3% Triton X-100], προθερμασμένο στους 65°C, περιέχοντας 0.2% X-gal και επώαστηκαν σε θάλαμο υγρασίας στους 37°C για ποικίλα χρονικά διαστήματα. Ειδικά για το πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκαν προνύμφες με έλλειψη των γονιδίων *E(spl)m7* και *m8*, αυτές επώαστηκαν μαζί με αγρίου τύπου προνύμφες για την ημιποσοτική μέτρηση της δραστηριότητας της β-γαλακτοσιδάσης. Οι γενότυποι των δύο προνυμφών μπορούσαν να διακριθούν με βάση τη μορφολογία τους.

Τα πειράματα ανοσοιστοχημικής ανίχνευσης πραγματοποιήθηκαν με αντισώματα προερχόμενα από την Developmental Studies Hybridoma Bank, Cappel, Jackson Immunochemicals και Molecular Probes. Για την περίπτωση του αντί-Hey, το αντίσωμα προήλθε από ορό ποντικών ανοσοποιημένων για την πρωτεΐνη His-Hey. Όλες οι ανοσοιστοχημικές χρώσεις σε έμβρυα, αναπτυξιακούς δίσκους και ΚΝΣ προνυμφών και φτερά νυμφών 24 ωρών πραγματοποιήθηκαν με βάση γνωστά πρωτόκολλα με αραιώση του αντισώματος 1/2000. Ειδικά για το ΚΝΣ προνυμφών η στερέωση έγινε σε διάλυμα 4% παραφορμαλδεύδης/1xPEM σε θερμοκρασία δωματίου για 20'.

Ειδικές συνθήκες απαιτούνται για τη χρήση του αντί-Ac αντισώματος: Διατηρημένες προνύμφες στερεώθηκαν σε διάλυμα 1xPEM [100 mM PIPES, 1mM EGTA, 1 mM MgCl₂ (pH 6.9) corrected with KOH], 1% TritonX-100, 1% PFA, για 1 ώρα στους 8°C. Όλες οι ακόλουθες πλύσεις και επωάσεις πραγματοποιήθηκαν σε διάλυμα 50 mM Tris-Cl (pH 6.8), 150 mM NaCl, 0.5% NP40 buffer, συμπληρωμένο με 1-5% NGS.

Όλα τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο Leica Diaplan ή σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP.

4.4 Παραγωγή και καθαρισμός της πρωτεΐνης His-Hey με χρωματογραφία συγγένειας μετάλλου.

Το cDNA του γονιδίου Hey κλωνοποιήθηκε σε τυφλή θέση BamHI του πλασμιδιακού φορέα pET16b ως EcoRI με τυφλά άκρα. Το πλασμίδιο μετασχηματίστηκε σε BL21 pLys στέλεχος. Μοναδικές αποικίες εμβολιάστηκαν σε μικρής κλίμακας υγρές καλλιέργειες για την εξακρίβωση παραγωγής της πρωτεΐνης υπό συνθήκες επαγωγής. Στο επόμενο στάδιο, η παραγωγή His-Hey πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε σε μεγαλύτερη κλίμακα. Σε υγρές καλλιέργειες περίπου 1 lt και σε OD_{600nm} 0.6 προστέθηκε IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν για ακόμη 3 ώρες στους 37°C. Στο τέλος αυτής της χρονικής περιόδου συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση, πλύθηκαν με 1xPBS για την απόμάκρυνση εναπομείνοντος θρεπτικού μέσου και εναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα ουρίας, οπότε και υποβλήθηκαν σε διάσπαση με υπέρηχους παρουσία πρωτεϊνικών αναστολέων.

Ο επακόλουθος καθαρισμός πραγματοποιήθηκε υπό αποδιατακτικές συνθήκες με σφαιρίδια ρεσίνης επικαλυμμένων με ιόντα Ni και σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης της κατασκευάστριας εταιρείας (Qiagen). Τα κλάσματα έκλουσης εξετάστηκαν με τη μέθοδο Bradford για την περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνη και με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση για την

καθαρότητα της εκλούμενης πρωτεΐνης. Στη συνέχεια διαχωρίστηκαν σε μικρές δόσεις και φυλάχθηκαν στους -20°C παρουσία 1M ουρίας.

Περίπου 50γ πρωτεΐνης ανά ποντίκι χρησιμοποιήθηκαν για κάθε ένεση ανοσοποίησης. Η ανοσοποίηση έγινε σύμφωνα με καθιερωμένες τεχνικές.

4.5 Σύστημα δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*.

Το σύστημα των δύο υβριδίων που χρησιμοποιήθηκε προήλθε από την εταιρία OriGene και έχει χρησιμοποιηθεί από τους Alifragis et al (1997). Περιληπτικά, βασίζεται σε τρεις πλασμιδιακούς φορείς: τον pEG202NLS (*His*), ο οποίος προσφέρει δυνατότητες κλωνοποίησης cDNA σε μεταφραστική σύντηξη με την βακτηριακής προέλευσης περιοχή πρόσδεσης στο DNA LexA, καθώς και με αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού, τον pJG4-5 (*Trp*), ο οποίος προσφέρει δυνατότητες κλωνοποίησης cDNA σε μεταφραστική σύντηξη με την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής B42 και τον υψηλής ευαισθησίας pSH1834 (*Ura*) που φέρει το γονίδιο αναφοράς β-γαλακτοσιδάση (*lacZ*) υπό τον έλεγχο πολυμερισμένων LexA θέσεων πρόσδεσης. Τα cDNA γονιδίων ή τμήματα αυτών παρήχθησαν με αντίδραση PCR και κλωνοποιήθηκαν (κυρίως) ως EcoRI/XhoI τμήματα στις EcoRI/Sall ή EcoRI/XhoI θέσεις των πλασμιδίων PEG202NLS ή PGJ4-5 αντιστοίχως. Τα στελέχη ζύμης που χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό είναι τα EGY48 (*Mata, trp1, his3, ura3, leu2::δLexAop-LEU2*), που μετασχηματίστηκαν με φορείς pEG202NLS και pSH1834, και τα FT4 (*Mata, trp1, his3, ura3, leu2*), που μετασχηματίστηκαν με φορείς pJG4-5. Μετά από σύζευξη σε τριβλία με πλούσιο θρεπτικό υλικό για 24 ώρες, τα διπλοειδή κύτταρα επιλέχθησαν βάσει αυξοτροφιών σε τριβλία με ελάχιστο θρεπτικό μέσο. Η παραγωγή των υπό μελέτη πρωτεϊνών επήχθη στα κύτταρα της ζύμης με μεταφορά αποικιών σε τριβλία με θρεπτικό μέσο γαλακτόζης/ραφινόζης ως πηγή άνθρακα και X-gal ως υπόστρωμα της β-γαλακτοσιδάσης. Η ένταση της αλληλεπίδρασης εκτιμήθηκε βάσει της ποιοτικής εξέτασης της έντασης του χρώματος των αποικιών που αναπτύχθηκε μετά από 24ωρη επώαση. Όλες οι επώσεις πραγματοποιήθηκαν στους 30°C.

4.6 Ανάλυση αλληλεπιδράσεων ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών, παρηγμένων in vitro, με GST πρωτεΐνες.

Το cDNA του E(spl)m7 γονιδίου ή τμήματα αυτού κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα (pGEX4T-1, Amersham Pharmacia) ως EcoRI/XhoI τμήματα σε μεταφραστική σύντηξη με την περιοχή GST. Τα πλασμίδια που προέκυψαν μετασχηματίστηκαν σε *E.coli* BL21pLys βακτηριακά στελέχη (Stratagene). Η παραγωγή των ετερόλογων πρωτεϊνών επήχθη σε υγρές καλλιέργειες 250ml OD600nm 0.8-1.0, με 0.1 mM IPTG, και περαιτέρω

επίπωση στους 37°C για 1 ώρα. Μετά από φυγοκέντρηση, τα βακτήρια που συλλέχθηκαν, πλύθηκαν με παγωμένο 1xPBS για την απομάκρυνση κατάλοιπων θρεπτικού μέσου και, αφού εναιωρήθηκαν σε 1xPBS-0.1% Triton X100 επωάστηκαν σε πάγο παρουσία λυσοζύμης για 20 λεπτά. Εν συνεχεία, διασπάστηκαν με υπέρηχους, παρουσία αναστολέων πρωτεασών, φυγοκεντρήθηκαν και τα διαλυτά κλάσματα των λυμάτων φυλάχθηκαν παρουσία 10% γλυκερόλης στους -80°C. Δείγματα των κλασμάτων χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση της εκάστοτε GST πρωτεΐνης με ηλεκτροφόρηση καθαρισμένων ποσοτήτων και ακόλουθη εκτίμηση των SDS-PAGE gels με χρώση με Coomassie blue. Στο επόμενο στάδιο, 1-5γ κάθε GST πρωτεΐνης ακινητοποιήθηκε πάνω σε 30λ σφαιριδίων αραρόζης-γλουταθειόνης για την αλληλεπίδραση με *in vitro* μεταφρασμένες παρουσία ραδιενέργειας πρωτεΐνες. Η *in vitro* μετάφραση ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών έγινε με το εμπορικό kit αντιδραστηρίων TnT/T7 της Promega ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

4.7 Πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων S2.

Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς το *UAS-tk-luc*. Ο ενισχυτής *UAS* εξήχθη από το πλασμίδιο pUAST ως BamHI-HpaI τμήμα και υποκλωνοποιήθηκε με τυφλά άκρα στη θέση SmaI στο πλασμίδιο PGL3tkluc, προηγούμενο του βασικού υποκινητή του γονιδίου της θυμιδίνης της κινάσης και του γονιδίου της λουσιφεράσης. Το πλασμίδιο έκφρασης RGDBD δημιουργήθηκε με την υποκλωνοποίηση της περιοχής πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 του ζαχαρομύκητα (GDBD), προερχόμενο αρχικά ως HindIII/XbaI τμήμα από το πλασμίδιο pBXG1 (Brown et al 1998), τροποποιημένο έτσι ώστε να αποκτήσει τυφλά άκρα, σε τροποποιημένη Sall θέση στο πλασμίδιο RactHAdh. Το cDNA του γονιδίου Scute ή τμήματα αυτού κλωνοποιήθηκαν ως SmaI/Xho ενθέματα στις θέσεις SmaI/Sall του RGDBD για την παραγωγή πρωτεϊνών συζευγμένων με το καρβοξυτελικό άκρο της GDBD περιοχής. Τα *E(spl)* γονίδια κλωνοποιήθηκαν στο πλασμίδιο RactHAdh (Swevers et al 1996). Τα γονίδια Ract-m7 και Ract-m7ΔW περιγράφονται στη διαδακτορική διατριβή του Παύλου Αλιφραγκή. Το Ract-m7KNEQ κλωνοποιήθηκε ως EcoRI/Sall με τυφλά άκρα σε θέση BamHI. Στην ίδια θέση και με την ίδια στρατηγική κλωνοποιήθηκαν όλα τα γονίδια *E(spl)m7* που φέρουν σημειακές μεταλλαγές στην περιοχή Orange (το *E(spl)m7NTEK* με τυφλά άκρα EcoRI/XhoI, τα *E(spl)m7TNHQ* και *E(spl)m7SA* με τυφλά άκρα NotI). Επίσης, το γονίδιο *E(spl)m7ΔOrange* (φέρει έλλειψη της περιοχής που βρίσκεται μεταξύ δύο εσωτερικών Hinfl θέσεων στο cDNA του *E(spl)m7*) κλωνοποιήθηκε ως EcoRI/XbaI με τυφλά άκρα στη BamHI πλασμιδίου Ract. Τα μεταλλαγμένα cDNA προέκυψαν ως PCR προϊόντα σε δύο στάδια: στο πρώτο στάδιο χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές, εκ των οποίων ο ένας έφερε την επιθυμητή μεταλλαγή, για την

παραγωγή τμήματος του cDNA του γονιδίου. Το προϊόν αυτό χρησιμοποιήθηκε σε δεύτερο στάδιο ως εκκινητής (megaprimer) σε συνδυασμό με εκκινητή κατάλληλο για την παραγωγή του πλήρους μήκους cDNA. Τα προϊόντα κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pGEMT-easy της Promega για τον έλεγχο της αλληλουχίας τους.

Τα πλασμίδια καθαρίστηκαν με κολώνες τύπου QIAGEN ή με τη μέθοδο του CsCl. Η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιήθηκε είναι $2\mu\text{g}/10^6$ κύτταρα. Τα επιθυμητά πλασμίδια συνδιαμολύνθηκαν με πλασμίδιο, που περιέχει το *hs-lacZ* είναι απαραίτητη, για να υπολογίσουμε την επιτυχία του μετασχηματισμού. Στην περίπτωση μας χρησιμοποιούσαμε 400ng *UAS-tk-luc* ως γονίδιο ανταποκριτή για κάθε αντίδραση. Τα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα παρήχθησαν με εναιώρηση των κυττάρων 40-48 ώρες μετά τη διαμόλυνσή τους (που πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ιζήματος φωσφόρου) σε $100\mu\text{l}$ ειδικού διαλύματος (breaking buffer) της εταιρίας PROMEGA και τρεις κύκλους ψύξης-αποψύξης.

Η δραστικότητα της β-γαλακτοσιδάσης μετρήθηκε με την προσθήκη $25\mu\text{l}$ εκχυλίσματος σε $300\mu\text{l}$ διαλύματος γαλακτοσιδάσης (60mM Na_2HPO_4 , 40mM NaH_2PO_4 , 10mM KCl 1mM MgSO_4) στο οποίο προσθέτουμε $13.5\mu\text{l}$ μερκαπτοαιθανόλης (ανά 5 ml δτος) ακριβώς πριν τη χρήση. Έπειτα προσθέτουμε $60\mu\text{l}$ ONPG (4mg/ml) και επωάζουμε στους 37°C , μέχρι να κιτρινίσει το διάλυμα, οπότε και σταματάμε την αντίδραση προσθέτοντας $500\mu\text{l}$ Na_2CO_3 (1M). Στη συνέχεια φωτομετρούμε στα 420nm , χρησιμοποιώντας νερό ως τυφλό δείγμα. Για τη μέτρηση της λουσιφεράσης ακολουθήθηκαν οι οδηγίες της εταιρίας PROMEGA. Συγκεκριμένα, αναμείχθηκαν 5λ ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και 20λ υποστρώματος. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο λουμινόμετρο.

Για να είναι συγκρίσιμες οι τιμές της ενεργότητας της λουσιφεράσης από το ένα δείγμα στο άλλο, η τιμή μέτρησης του λουμινόμετρου διαιρέθηκε με την τιμή ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης, σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο: $\text{luc} \times t^{\text{lac-Z}} / \text{OD}_{420}$. Το luc, συμβολίζει την τιμή του λουμινόμετρου, το $t^{\text{lac-Z}}$ το χρόνο από την αρχή μέχρι το σταμάτημα της αντίδρασης της γαλακτοσιδάσης και το OD_{420} την τιμή της φωτομέτρησης στα 420nm του διαλύματος της αντίδρασης της γαλακτοσιδάσης.

5 Αποτελέσματα (Μέρος Α)

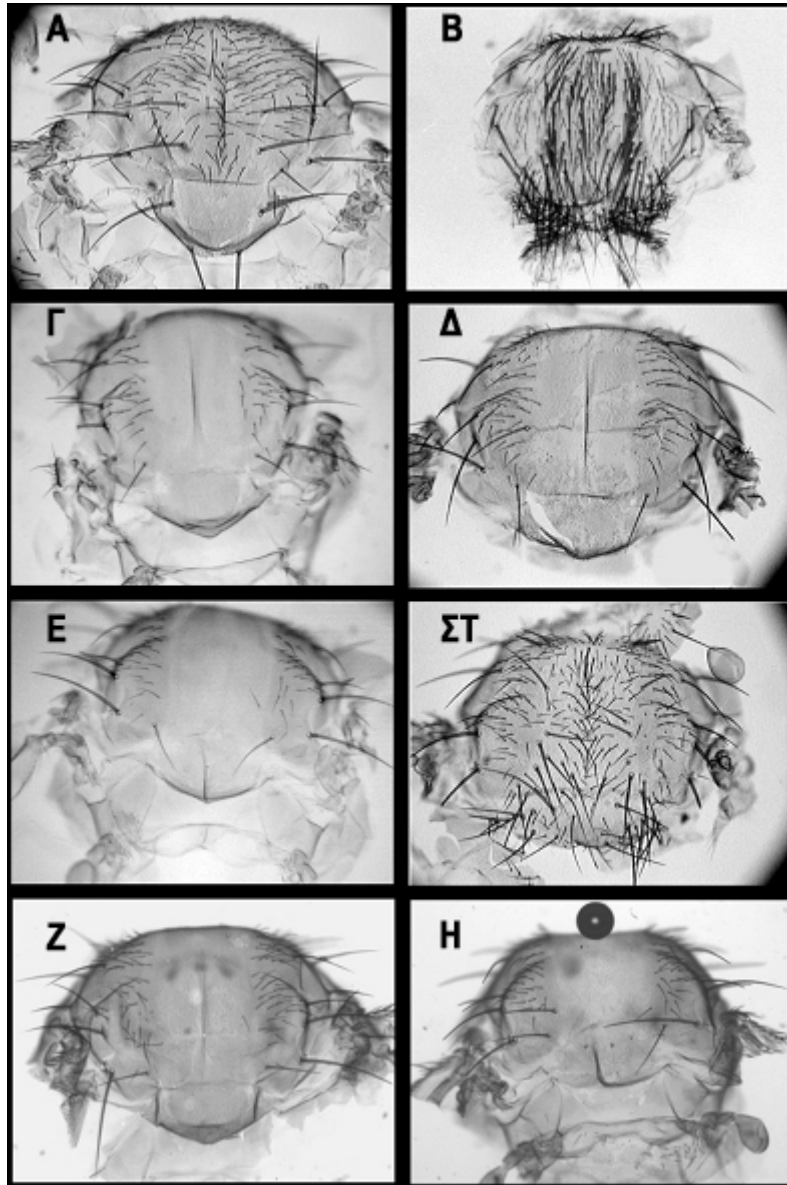
5.1 Οι πρωτεΐνες E(spl) καταστέλλουν γονίδια στόχους των προνευρικών πρωτεϊνών.

Στην **Εικ. 8 (Α, Β)** φαίνεται ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Scute (Sc) προάγει την ανάπτυξη εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων στο θώρακα ενήλικων ατόμων, ενώ αυτή παρεμποδίζεται σε συνθήκες υπερέκφρασης των πρωτεϊνών E(spl)m7 και E(spl)mδ, όπως αναμένεται (Hinz et al 1994, Ligoxygakis et al 1999), αλλά και της πρωτεΐνης E(spl)m7KNEQ (**Εικ. 8 Γ,Ε,Ζ αντιστοίχως**). Η E(spl)m7KNEQ φέρει τις μεταλλαγές στα αμινοξέα K15 και E22 της βασικής περιοχής της πρωτεΐνης E(spl)m7 σε N και Q αντιστοίχως. Οι σημειακές αυτές μεταλλαγές, που έχουν εισαχθεί τεχνητά, καταργούν την ικανότητά της να προσδένεται στο DNA (Jimenez and Ish-Horowitz 1997). Επομένως, η ικανότητα πρόσδεσης των E(spl) πρωτεϊνών δεν είναι απαραίτητη για την κατασταλτική τους δράση.

Η ανάπτυξη των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων παρεμποδίζεται πλήρως από τις E(spl)m7 και E(spl)m7KNEQ πρωτεΐνες και μερικώς από την πρωτεΐνη E(spl)mδ ακόμα και σε συνθήκες συνυπερέκφρασής τους με την πρωτεΐνη Sc **Εικ. 8 (Δ, ΣΤ, Η)**. Αυτό υποδεικνύει ότι οι E(spl) πρωτεΐνες πρέπει να δρουν κατασταλτικά (και ανταγωνιστικά ως προς την πρωτεΐνη Sc) κυρίως επί των ιδίων γονιδίων στόχων, εκείνων δηλαδή που είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων. Ειδικότερα, λόγω συνυπερέκφρασης της προνευρικής πρωτεΐνης Sc, η μεταγραφική ρύθμιση των ενδογενών προνευρικών γονιδίων δεν κατέχει πλέον πρωτεύοντα ρόλο. Συνεπώς η δράση των E(spl) πρωτεϊνών κατευθύνεται δευτερευόντως έναντι των ίδιων των προνευρικών γονιδίων, αντίθετα ίσως με ότι πιστευόταν μέχρι σήμερα (Martin-Bermudo et al., 1995; Skeath and Carroll, 1992).

Μερικά από τα γονίδια – στόχους των προνευρικών- είναι τα ίδια τα προνευρικά, συμπεριλαμβανομένου το *scute*, το οποίο εκφράζεται στους προνευρικούς συναθροισμούς (βλ. εισαγωγή) και το *asense*, του οποίου η έκφραση ενεργοποιείται στο SOP αμέσως μετά την επιλογή του. Ωστόσο, και στα δύο γονίδια έχει παρατηρηθεί ότι στις ρυθμιστικές τους ακολουθίες περιέχονται θέσεις πρόσδεσης τόσο για τις προνευρικές πρωτεΐνες όσο και για τις πρωτεΐνες E(spl). Πως επιτυγχάνεται η ειδικότητα της απόκρισης των παραπάνω γονιδίων? Επίσης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του παραπάνω πειράματος η ικανότητα πρόσδεσης των E(spl) πρωτεϊνών στο DNA δεν είναι απαραίτητη. Ποιος είναι λοιπόν ο ρόλος των θέσεων πρόσδεσης στις ρυθμιστικές αλληλουχίες των παραπάνω γονιδίων και γιατί οι E(spl) πρωτεΐνες διαθέτουν την εξελικτικά συντηρημένη βασική περιοχή που τους προσδίδει

ικανότητα πρόσδεσης στο DNA? Είναι πιθανό να δρουν σαν την πρωτεΐνη Emsc, η οποία σχηματίζει με τους μεταγραφικούς παράγοντες που αλληλεπιδρά ανενεργά ως προς την πρόσδεσή τους στο DNA σύμπλοκα? Επιπρόσθετα, που οφείλεται η διαφορετική ικανότητα των πρωτεϊνών E(spl)m7 και E(spl)m7KNEQ σε σχέση με την πρωτεΐνη E(spl)mδ να παρεμποδίζουν τη νευρογένεση?



Εικόνα 8: Επίδραση της υπερέκφρασης διάφορων bHLH πρωτεϊνών στο πρότυπο των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων στο θώρακα ενήλικων ατόμων: **A)** Αγρίου τύπου θώρακας, **B)** Υπερέκφραση *sc*, **Γ, Ε, Ζ)** Υπερέκφραση *E(spl)m7* (**Γ**), *E(spl)mδ* (**Ε**), *E(spl)m7KNEQ* (**Ζ**), **Δ, ΣΤ, Η)** Συνυπερέκφραση *sc* και των διαγονιδίων σε **Γ, Ε, Ζ** αντιστοίχως.

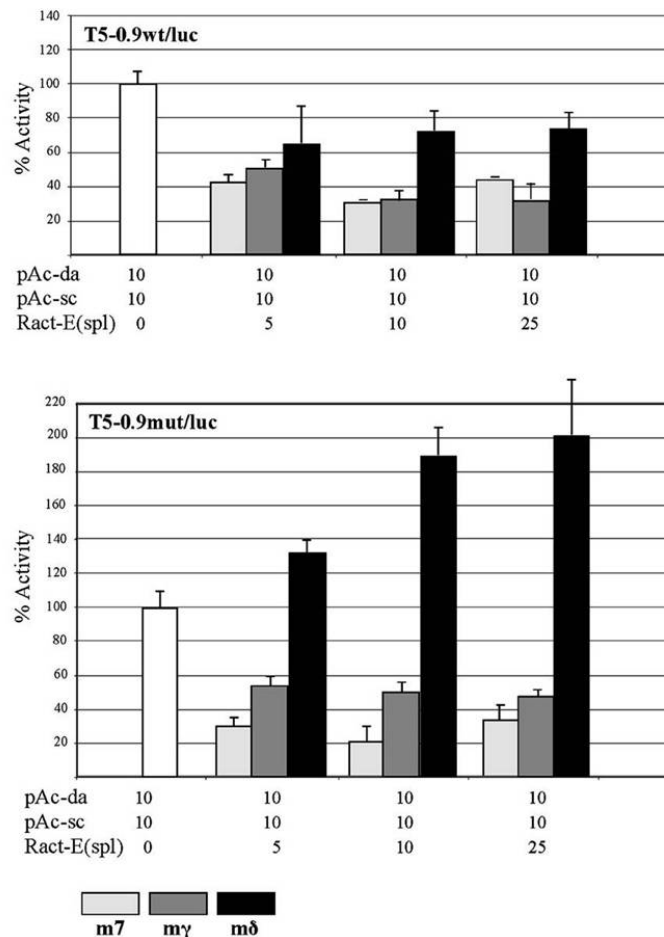
5.2 Ορισμένες πρωτεΐνες E(spl) μπορούν να καταστείλουν γονίδια στόχους χωρίς πρόσδεση στο DNA.

Οι πρώτες ενδείξεις για το γεγονός ότι η πρόσδεση των E(spl) πρωτεϊνών στις E_{B/C} αλληλουχίες δεν είναι απαραίτητη για την κατασταλτική δράση τους προέκυψαν από πειράματα παροδικής διαμόλυνσης S2 κυττάρων και μέτρηση της δραστηριότητας του γονιδίου ανταποκριτή λουσιφεράση (*luc*), η έκφραση της οποίας ελεγχόταν από την 5' εγγύς (μήκος περίπου 900 ζευγαριών βάσεων) ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου *ac* (T5) (Ohsako et al., 1994). Η περιοχή αυτή επιτελεί πιθανότατα αυτορυθμιστική λειτουργία, καθώς περιέχει τρεις E_A αλληλουχίες, θέσεις πρόσδεσης των ετεροδιμερών των μεταγραφικών ενεργοποιητών Sc ή Ac με την πρωτεΐνη Da. Επίσης, περιέχει μία τύπου C αλληλουχία, απαραίτητη για την καταστολή από την πρωτεΐνη Hairy, η οποία είναι παρόμοια με τις E(spl) πρωτεΐνες (Ohsako et al., 1994, Van Doren et al. 1994).

Η ταυτόχρονη υπερέκφραση E(spl), Da και Sc σε S2 κύτταρα οδήγησε σε καταστολή της ενεργότητας της λουσιφεράσης, όπως άλλωστε θα αναμενόταν λόγω της πρόσδεσης των E(spl) στη θέση C. Προς επιβεβαίωση της σημασίας της πρόσδεσης στο DNA, χρησιμοποιήθηκε μία μεταλλαγμένη στην θέση C μορφή του παραπάνω υποκινητή (T5m) (αποτελέσματα Παύλου Αλιφραγκή από Giagtzoglou et al. 2003, **Εικ. 9**). Η μεταλλαγή αυτή πιθανότατα αποκλείει την πρόσδεση των E(spl) πρωτεϊνών, όπως αποκλείεται η πρόσδεση και η κατασταλτική δράση της πρωτεΐνης Hairy (Ohsako et al., 1994). Ομοίως με τη Hairy, η E(spl)^{mδ} έχασε την κατασταλτική της ιδιότητα. Αντιθέτως, η κατασταλτική δράση των πρωτεϊνών E(spl)^{m7} και ^{mγ} επί της ενεργότητας της λουσιφεράσης δεν μειώθηκε. Είναι λοιπόν φανερό ότι διαφορετικές E(spl) πρωτεΐνες δρουν με διαφορετικό τρόπο: η E(spl)^{mδ} δρα κατά ένα τρόπο εξαρτώμενο από τη πρόσδεσή της στις αντίστοιχες θέσεις DNA (όπως και η Hairy), ενώ οι E(spl)^{m7} και ^{mγ} μπορούν να καταστέλλουν χωρίς να είναι απαραίτητη η πρόσδεσή τους στις αντίστοιχες αλληλουχίες.

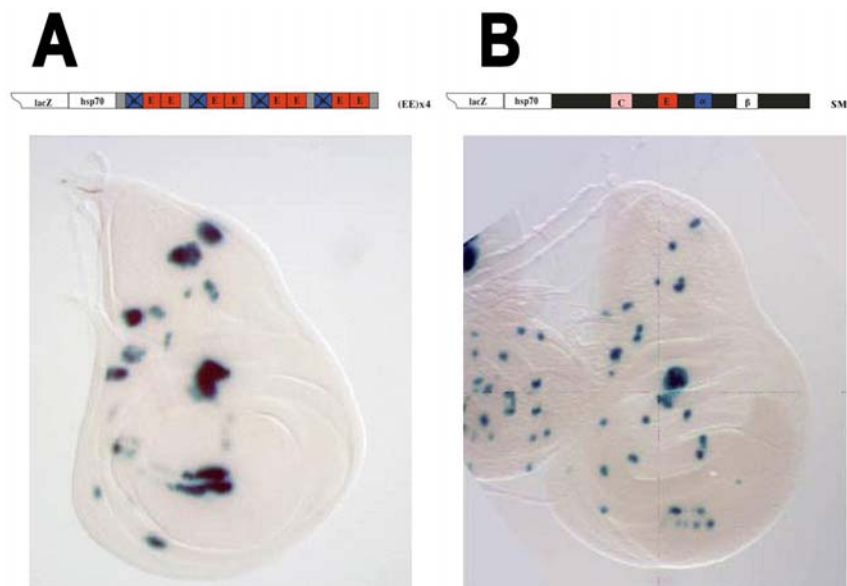
Η πιθανή ύπαρξη μη τυπικών, θέσεων στον εγγύς υποκινητή του *ac*, στις οποίες οι E(spl) πρωτεΐνες είναι δυνατόν να προσδένονται (Chen et al. 1997, Culi and Modolell 1998, Yang et al. 2001) μπορεί να είναι η αιτία για την ικανότητα των E(spl)^{m7} και E(spl)^{mγ} πρωτεϊνών να καταστέλλουν ακόμα και τον μεταλλαγμένο στη θέση C υποκινητή του *ac*. Γι' αυτό το σκοπό, η χρήση ενός *in vivo* συστήματος κρίθηκε ως η καταλληλότερη πειραματική μέθοδος. Πιο αναλυτικά, η απόκριση του γονιδίου *lacZ*, και κατ' επέκταση η απόκριση του συνθετικού ενισχυτή που ελέγχει την έκφραση του, μελετήθηκαν σε διαγονιδιακά στελέχη *Drosophila melanogaster*. Ο συγκεκριμένος ενισχυτής, επωνομαζόμενος ως *EE4*, αποτελείται

από οκτώ E_A αλληλουχίες πρόσδεσης, διατεταγμένες σε σειρά μπροστά από το βασικό υποκινητή του γονιδίου *hsp70* και το γονίδιο *lacZ*. Στις αλληλουχίες αυτές οι $E(\text{spl})$ πρωτεΐνες δεν μπορούν να προσδεθούν, σε αντίθεση με τα ετεροδιμερή Da/Sc και Da/Ac . Γι' αυτό και ο ενισχυτής αυτός είναι ενεργός σε όλους τους προνευρικούς συναθροισμούς του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού, αποκρινόμενος στην δραστικότητα των ενδογενών προνευρικών πρωτεϊνών (Εικ. 10) (Culi και Modolell, 1998). Έτσι, η συμπεριφορά του $EE4$, ενός ενισχυτή δηλαδή όπου δεν προσδέονται οι $E(\text{spl})$ πρωτεΐνες, θα μπορούσε να απαντήσει με μεγαλύτερη βεβαιότητα το ερώτημα κατά πόσο οι $E(\text{spl})$ πρωτεΐνες είναι ικανές για καταστολή γονιδίων ανεξάρτητα από την πρόσδεσή τους σε αλληλουχίες στόχους στο DNA. Η δοκιμασία της απόκρισης του $EE4$ στις $E(\text{spl})$ πρωτεΐνες πραγματοποιήθηκε σε αναπτυξιακούς δίσκους φτερού προνυμφών 3^{ου} σταδίου *Drosophila*, όπου τα γονίδια *ac* και *sc* ήδη εκφράζονται στους προνευρικούς συναθροισμούς των μακροχαιτών του θώρακα και των αισθητηρίων οργάνων του φτερού.

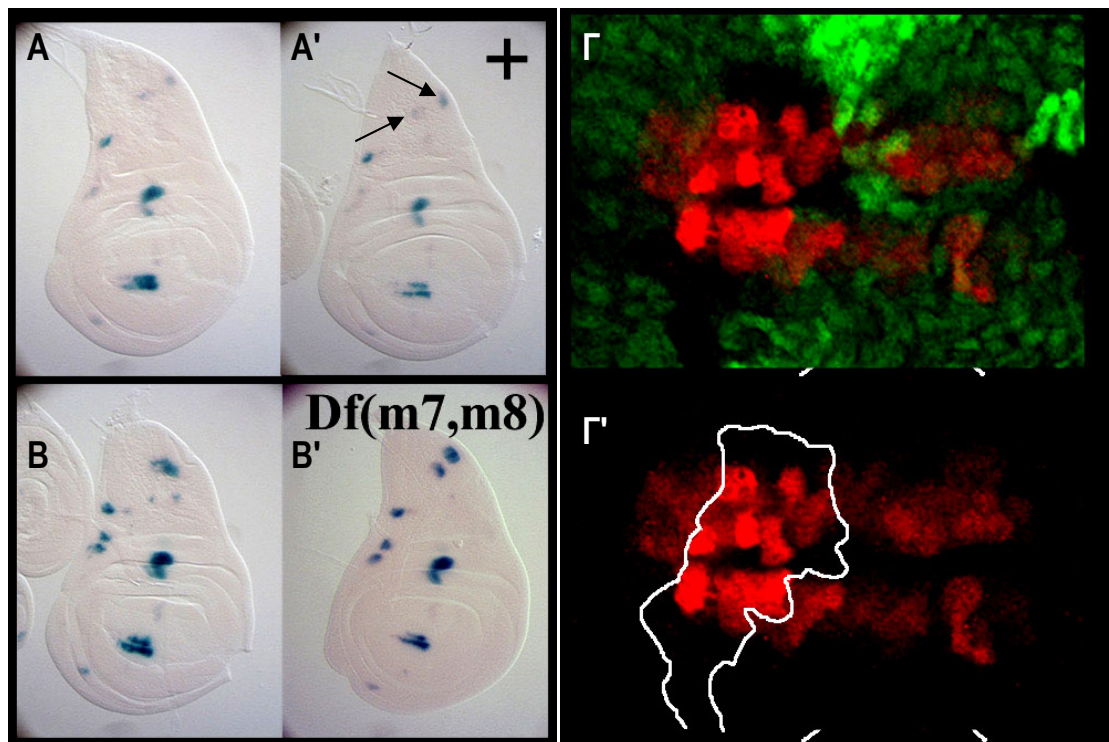


Εικόνα 9: Μεταβολή της θετικής απόκρισης των ενισχυτών T5 (A) και T5m (B) σε Da/Sc ετεροδιμερών, παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων διαφόρων $E(\text{spl})$ πρωτεϊνών.

Πρωταρχικά, το πρότυπο της έκφρασης του *EE4-lacZ* ενισχυτή ελέγχθηκε σε συνθήκες έλλειψης λειτουργίας των *E(spl)* γονιδίων (**Εικ. 11**). Όταν τα γονίδια *E(spl)m7* και *E(spl)m8* εκλείπουν από το γενετικό υπόβαθρο του στελέχους *Drosophila*, ο *EE4-lacZ* φαίνεται να είναι πιο ενεργός σε σύγκριση με αγρίου τύπου στελέχη (**Εικ. 11 A-A', B-B'**). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα γονίδια *E(spl)m7* και *E(spl)m8* εκφράζονται περισσότερο από κάθε άλλο γονίδιο του *E(spl)* συμπλόκου (*E(spl)-C*) στους προνευρικούς συναθροισμούς του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού (de Celis et al 1996). Ωστόσο, η έλλειψή τους δεν προκαλεί καμία αλλαγή στον αριθμό και στο πρότυπο των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων στο ενήλικο άτομο, πιθανότατα λόγω των λοιπών *E(spl)* γονιδίων και της δυνατότητάς τους για λειτουργική αντικατάσταση. Επιπλέον, η δραστηριότητα του *EE4* ενισχυτή ελέγχθηκε υπό συνθήκες έλλειψης όλου του γενετικού τόπου *E(spl)-C*, οπότε και πάλι παρατηρείται αύξηση των επιπέδων *EE4-lacZ* (**Εικ. 11 Γ-Γ'**). Συνεπώς, η δραστηριότητα των ενδογενών *E(spl)* πρωτεϊνών, ιδιαίτερα των *E(spl)m7* και *m8*, μειώνει την απόκριση του *EE4* ενισχυτή. Είναι πιθανό αυτό να συμβαίνει είτε άμεσα, επειδή κανονικά οι *E(spl)* πρωτεΐνες στρατολογούνται στον *EE4* ενισχυτή, είτε έμμεσα, μέσω δηλαδή της αποκαταστολής και επακόλουθης αύξησης της έκφρασης των ενεργοποιητών-προνευρικών γονιδίων *ac* και *sc*.



Εικόνα 10: Πρότυπο έκφρασης συνθετικού ενισχυτή *EE4* (**A**), ο οποίος αποτελεί απλουστευμένη έκδοση του ενισχυτή *SMC* (**B**) του γονιδίου *sc* σε αναπτυξιακούς δίσκους φτερού 3ου προνυμφικού σταδίου, μετά από ιστοχημική χρώση για ανίχνευση δραστηριότητας *lacZ*. Ο ενισχυτής *EE4* είναι ενεργός σε όλα τα κύτταρα του προνευρικού συναθροισμού, ενώ ο ενισχυτής *SMC* ενεργοποιείται μόνο στα μελλοντικά πρόδρομα κύτταρα αισθητηρίων οργάνων. Αυτό μάλλον οφείλεται στην παρουσία μοτίβων *C* και *a*, αν και η συμμετοχή και άλλων παραγόντων δεν έχει αποκλεισθεί.



Εικόνα 11: (A'-B') Η έλλειψη των γονιδίων *E(spl)m7* και *m8* προκαλεί την αύξηση της δραστηριότητας του *EE4* ενισχυτή στους προνευρικούς συναθροισμούς (ιδιαίτερα εμφανής σε αυτούς των νώτων, όπως δείχνουν τα βέλη) σε σχέση με τα επίπεδα σε αγρίου τύπου αναπτυξιακούς δίσκους προνύμφης (A-B). Γ) πράσινο: GFP, η έλλειψη της οποίας μαρτυρεί τις περιοχές ομόζυγες για το αλληλόμορφο *Df(3R)b32.2* [έλλειψη του γενετικού τόπου *E(spl)*], κόκκινο: αντι-LacZ, Γ') μόνο το κόκκινο κανάλι του Γ. Η η αποκαταστολή του ενισχυτή παρατηρείται (ως πιο έντονη ανοσοιστοχημική χρώση για πρωτεΐνη LacZ) σε κλώνους κυττάρων (περικυκλωμένα από την άσπρη γραμμή - Γ') που είναι ομόζυγα για έλλειψη όλου του γονιδιακού συμπλόκου *E(spl)* (Γ-Γ').

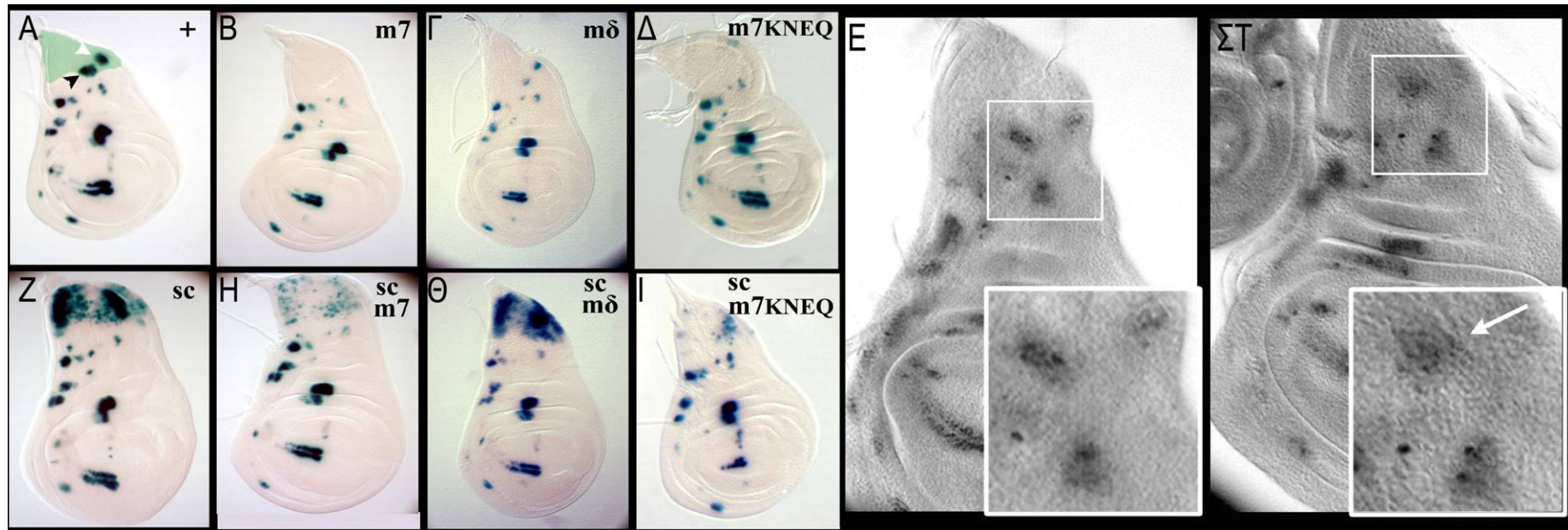
Αντιστρόφως, το πρότυπο έκφρασης του *EE4-lacZ* μελετήθηκε και σε συνθήκες υπερέκφρασης των *E(spl)*. Τα πειράματα υπερέκφρασης διεξάχθηκαν σε δύο διαφορετικές περιοχές του αναπτυξιακού δίσκου με πανομοιότυπα αποτελέσματα. Σε όλες τις περιπτώσεις, η υπερέκφραση της *E(spl)m7* κατέστειλε πλήρως την έκφραση *EE4-lacZ*, ενώ η έκφραση της *E(spl)mδ* απλά τη μείωσε, αν και αισθητά (**Εικ. 12 Α-Γ**).

Η παρατήρηση αυτή έθεσε τα εξής ερωτήματα: με ποιόν τρόπο οι δύο *E(spl)* πρωτεΐνες, *m7* και *mδ*, μπορούν να καταστείλουν την ενεργότητα ενός υποκινητή στον οποίο αποδεδειγμένα δεν μπορούν να προσδεθούν (Culi and Modolell, 1998, Jennings et al., 1999, Oellers et al. 1994) και σε τι οφείλεται η διαφορική κατασταλτική ικανότητά τους;

Μία πιθανή ερμηνεία για την αιτία της δράσης των *E(spl)m7* και *mδ* πρωτεϊνών στον *EE4* ενισχυτή θα ήταν ότι η υπερέκφρασή τους οδηγεί στην καταστολή των ενδογενών προνευρικών γονιδίων (σε αντιστοιχία με το ότι η απομάκρυνσή τους μπορεί να τα αποκαταστέλλει), η έκφραση των οποίων είναι απαραίτητη για την ενεργότητα του *EE4*. Ο έλεγχος αυτής της πιθανότητας έγινε με ιστοχημική χρώση των αναπτυξιακών δίσκων του φτερού για την ανίχνευση της προνευρικής πρωτεΐνης *Achaete (Ac)*, υπό συνθήκες υπερέκφρασης *E(spl)m7* (**Εικ. 12 Ε, ΣΤ**). Ποιοτικά, το γενικό πρότυπο έκφρασης της *Ac* έμεινε αναλλοίωτο, αφού τα επίπεδα της πρωτεΐνης δεν μειώθηκαν σημαντικά στα όρια της περιοχής υπερέκφρασης. Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο ότι ποτέ δεν παρατηρήθηκαν πρόδρομα νευρικά κύτταρα που να εκφράζουν *Ac* εντονότερα από τα γειτονικά τους, γεγονός που έχει χαρακτηριστεί ως το πιο πρώιμο, απαραίτητο κυτταρικό συμβάν κατά τη διαδικασία επιλογής του πρόδρομου νευρικού κυττάρου από τον προνευρικό συναθροισμό (Culi and Modolell, 1998). Η παραπάνω παρατήρηση συμφωνεί με την κατασταλτική ιδιότητα των *E(spl)* πρωτεϊνών επί αυτής της αύξησης της έκφρασης των προνευρικών πρωτεϊνών στη διαδικασία σχηματισμού του πρόδρομου νευρικού κυττάρου (Culi and Modolell, 1998, Giebel and Campos-Ortega, 1997, Ligoxygakis et al 1999, Nakao and Campos Ortega 1996, Tata and Hartley 1995), συνηγορεί δε προς το συμπέρασμα πως η *E(spl)m7* δεν καταστέλλει την προνευρική ενεργότητα μέσω γενικευμένης μεταγραφικής καταστολής των προνευρικών πρωτεϊνών.

Για να διασφαλίσουμε ότι το αποτέλεσμα που παρατηρήθηκε δεν οφείλεται στη διακύμανση των ενδογενών επιπέδων των προνευρικών πρωτεϊνών εκπονήθηκαν πειράματα ιστοχημικής ανίχνευσης της δραστικότητας *lacZ* σε αναπτυξιακούς δίσκους φτερού υπο συνθήκες ταυτόχρονης υπερέκφρασης *E(spl)* και προνευρικής πρωτεΐνης *Sc*. (**Εικ. 12 Ζ-Θ**). Οι συνθήκες αυτές διασφάλισαν την ομοιόμορφη, εξωγενώς επιβαλλόμενη, έκφραση

προνευρικής πρωτεΐνης. Η υπερέκφραση μόνο της πρωτεΐνης Sc προκάλεσε την αναμενόμενη, ευρεία, αν και όχι ομοιόμορφη, εκτοπική ενεργοποίηση του *EE4-lacZ* γονιδίου αναφοράς. Άλλωστε, το φαινόμενο της ανομοιόμορφης ενεργότητας των προνευρικών πρωτεϊνών είχε παρατηρηθεί ξανά στο παρελθόν (Hinze et al. 1994) και πιθανότατα οφείλεται στην επαγωγή των ενδογενών *E(spl)* γονιδίων (Cooper et al. 2000, Nellesen et al. 1999) που καταστέλλουν τη δράση του Sc (Giebel and Campos-Ortega 1997, Hinze et al. 1994). Ταυτόχρονη υπερέκφραση *E(spl)m7* και Sc προκάλεσε πλήρη σχεδόν καταστολή του *EE4-lacZ*. Υπερέκφραση *E(spl)m7KNEQ*, με ταυτόχρονη ή όχι υπερέκφραση Sc, καταστέλλει το ίδιο ισχυρά την ενεργότητα του *EE4-lacZ* (Εικ. 12 Δ, Ι). Αντίθετα με την *E(spl)m7*, ταυτόχρονη υπερέκφραση *E(spl)mδ* και sc δεν επηρέασε την ενεργοποίηση του *EE4-lacZ* (Εικ. 12 Θ). Η *E(spl)mδ* φαίνεται να δρα κατασταλτικά στον *EE4-lacZ*, όχι επηρεάζοντας μετα-μεταγραφικά την πρωτεΐνη Scute, αλλά μόνο μέσω καταστολής της έκφρασης των ενδογενών προνευρικών πρωτεϊνών, συνθήκη η οποία καταργείται στα πειράματα ταυτόχρονης υπερέκφρασης καταστολέων και ενεργοποιητών. Άρα, η *E(spl)m7* μπορεί να ανταγωνίζεται την ενεργοποιητική λειτουργία του Sc σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο και να καταστέλλει το *EE4-lacZ* (α) χωρίς να είναι απαραίτητη η πρόσδεσή της στο DNA και (β) δρώντας απ' ευθείας στον *EE4* ενισχυτή (και όχι μειώνοντας τα επίπεδα των ενδογενών προνευρικών πρωτεϊνών).



Εικόνα 12: Εκτίμηση του προτύπου έκφρασης του *EE4-lacZ* (A-Δ, Z-I) και του γονιδίου *ac* (E, ΣΤ) σε αναπτυξιακούς δίσκους φτερού 3ου προνυμφικού σταδίου, υπό συνθήκες υπερέκφρασης διαφόρων bHLH πρωτεϊνών. Σε όλες τις περιπτώσεις η υπερέκφραση πραγματοποιήθηκε στα όρια της περιοχής έκφρασης του γονιδίου *prl* (χρωματισμένη με πράσινο, A), στην οποία περικλείονται οι προνευρικοί συναθροισμοί που καταδεικνύονται από τις κεφαλές βελών. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Sc ενεργοποιεί το *EE4* ενισχυτή (Z), ενώ η υπερέκφραση των πρωτεϊνών E(spl)m7 και m7KNEQ τον καταστέλλει (B, Δ), ακόμα και παρουσία εξωγενώς παρεχόμενης Sc (H, I). Αντίθετα, η πρωτεΐνη E(spl)mδ καταστέλλει σε μικρότερο βαθμό τον *EE4*, όταν υπερεκφράζεται μόνη της (Γ) και καθόλου όταν συνεκφράζεται με την πρωτεΐνη Sc (Δ). Είναι σημαντικό το γεγονός ότι η υπερέκφραση της E(spl)m7 δεν επηρεάζει το γενικό προτύπο έκφρασης των προνευρικών γονιδίων, όπως αποδεικνύεται από πειράματα ανοσοιστοχημικής χρώσης για τη πρωτεΐνη Ac (E, ΣΤ), παρά μόνο την συσσώρευσή τους σε μελλοντικά πρόδρομα νευρικά κύτταρα (σύγκριση του προνευρικού συναθροισμού που καταδεικνύεται από το λευκό βέλος στο ένθετο της ΣΤ, όπου υπερεκφράζεται η πρωτεΐνη E(spl)m7, με τον αντίστοιχο αγρίου τύπου στο ένθετο της E).

5.3 Η E(spl)m7 προσδένεται σε E_A αλληλουχίες μέσω προνευρικών πρωτεϊνών.

Έχει αποδειχθεί ότι οι E(spl) πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν διαφορικά και επιλεκτικά με προνευρικές πρωτεΐνες σε πειραματικό σύστημα δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα. Πιο συγκεκριμένα, η E(spl)m7 και mγ αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες Ac, Sc και Da, σε αντίθεση με τη πρωτεΐνη mδ, η οποία δεν αλληλεπιδρά με καμία από αυτές (Alifragis et al. 1997). Η διαφορά αυτή συσχετίστηκε με τη διαφορά που παρουσιάζουν η E(spl)m7 και E(spl)mγ με την E(spl)mδ στην καταστολή των *EE4* και *T5m* ενισχυτών, όπως έχει ήδη περιγραφεί στο προηγούμενο τμήμα. Τέθηκε το ερώτημα με ποιο τρόπο η αλληλεπίδραση της E(spl)m7 με τις προνευρικές πρωτεΐνες καθιστά δυνατή την κατασταλτική ικανότητά της, απουσία πρόσδεσης στο DNA. Είναι πιθανό οι E(spl) να απομακρύνουν τα σύμπλοκα των προνευρικών ενεργοποιητών από τις αλληλουχίες στόχους τους. Εναλλακτικά, οι E(spl) πρωτεΐνες μπορεί να αποκτούν πρόσβαση στις αλληλουχίες-στόχους χρησιμοποιώντας τα ήδη προσδεδεμένα στο DNA προνευρικά σύμπλοκα.

Η διάκριση μεταξύ των δύο παραπάνω πιθανοτήτων έγινε με τη βοήθεια της μεθόδου που είχε επινοηθεί από τους Jimenez και Ish-Horowitz (Jimenez και Ish-Horowitz, 1997) για τη διερεύνηση του κατά πόσο ένας μεταγραφικός καταστολέας δρα προσδεδεμένος ή όχι στο DNA. Η μέθοδος αυτή συνίσταται στη μετατροπή του υπό μελέτη μεταγραφικού καταστολέα σε μεταγραφικό ενεργοποιητή με την αντικατάσταση της περιοχής που είναι υπεύθυνη για την καταστολή με μία άλλη, ιικής προέλευσης και καλά χαρακτηρισμένη ως μεταγραφικά ενεργοποιητική περιοχή, επονομαζόμενη VP16. Με αυτόν τον τρόπο, η νέα, χιμαιρική πρωτεΐνη θα μπορεί να ενεργοποιήσει την μεταγραφή, στην περίπτωση που αυτή προσδένεται έμμεσα ή άμεσα στο DNA. Σε αντίθετη περίπτωση, κατά την οποία η εν λόγω πρωτεΐνη απλά απομακρύνει τους ενεργοποιητές, η παρουσία της VP16 περιοχής δε θα έχει καμία επίδραση στο τελικό αποτέλεσμα της μεταγραφικής καταστολής (**Εικ. 13 Α**).

Η υπερέκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης E(spl)m7VP16 σε αναπτυξιακούς δίσκους φτερού είχε ως συνέπεια την ενεργοποίηση του *EE4* ενισχυτή, υποδηλώνοντας ότι η πρωτεΐνη είχε πρόσβαση στο DNA. Η πρόσβαση πιθανότατα δεν ήταν άμεση, καθώς η ενεργοποίηση που παρατηρήθηκε δεν ήταν ομοιόμορφη και καθολική, αλλά συσχετιζόταν με το χαρακτηριστικό πρότυπο ενεργότητας των ενδογενών προνευρικών πρωτεϊνών (**Εικ. 13 Β-Γ**). Αυτό το πρότυπο ενεργοποίησης ήταν το πρώτο πειραματικό δεδομένο βάσει του οποίου σχηματίστηκε η υπόθεση ότι οι προνευρικές πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για τη στρατολόγηση της E(spl)m7VP16 στο DNA. Προέκταση της υπόθεσης αυτής είναι ότι στο μηχανισμό αυτό η

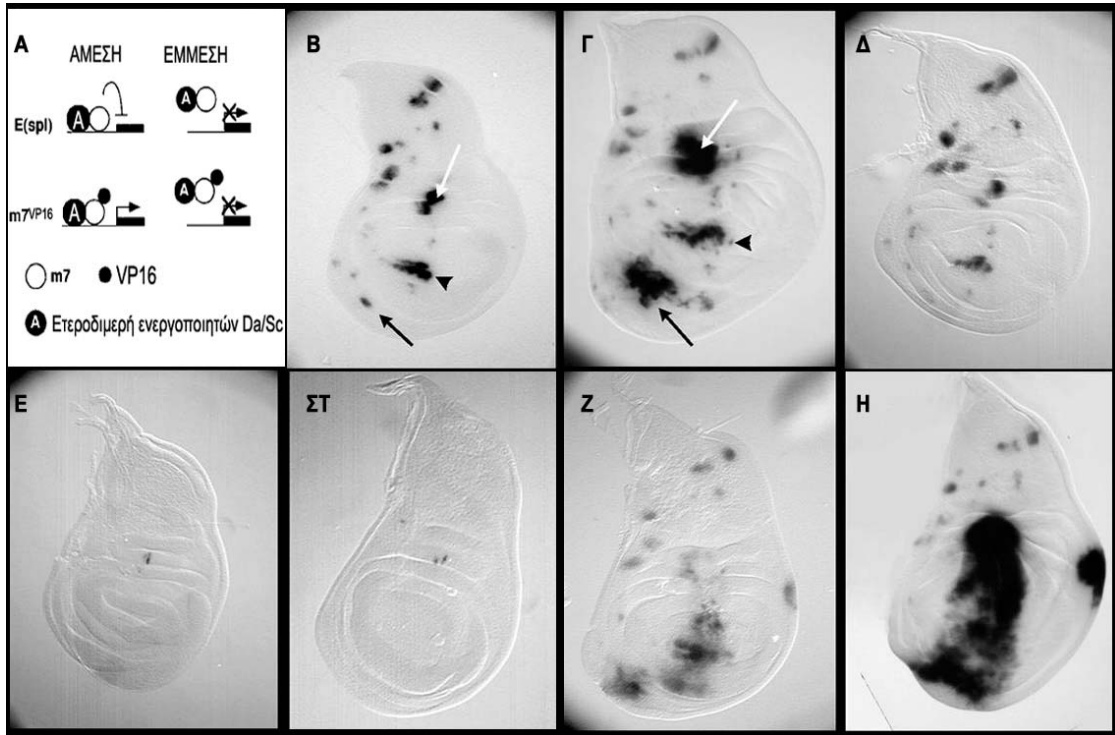
ικανότητα αλληλεπίδρασης των (χιμαιρικών) E(spl) πρωτεϊνών με τους προνευρικούς παράγοντες καθορίζει τη πρόσβασή τους στον EE4 ενισχυτή. Πράγματι, η υπερέκφραση της E(spl)mδVP16 (**Εικ. 13 Δ**), η οποία όπως και η E(spl)mδ δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με τις προνευρικές πρωτεΐνες, δεν προκάλεσε καμμία μεταβολή του προτύπου έκφρασης του ενισχυτή, επειδή πιθανότατα δεν έχει πρόσβαση στο DNA.

Τα παραπάνω συμπεράσματα ελέγχθησαν περαιτέρω με την εξέταση του προτύπου έκφρασης του EE4 ενισχυτή σε αναπτυξιακούς δίσκους που προέκυψαν από στελέχη sc^{10-1} , τα οποία φέρουν μία χρωμοσωμική έλλειψη, που αφαιρεί το γονίδιο *sc* και ένα μεγάλο μέρος του γονιδίου *ac*. Σε αυτούς τους δίσκους, τα γονίδια *ac* και *sc* δεν εκφράζονται καθόλου και γι' αυτό ο EE4 ενισχυτής είναι τελείως ανενεργός. Σε αυτό το γενετικό υπόβαθρο η E(spl)m7VP16 είναι τελείως ανίκανη να ενεργοποιήσει την έκφραση του ενισχυτή (**Εικ. 13 Ε, ΣΤ**). Εάν όμως ταυτόχρονα με την E(spl)m7VP16 υπερεκφραστεί και Sc (**Εικ. 13 Θ**) τότε η απόκριση του ενισχυτή EE4 γίνεται καθολική και ομοιόμορφη. Άρα, η διαθεσιμότητα και η χωρική κατανομή των προνευρικών πρωτεϊνών είναι κρίσιμες παράμετροι για την ενεργοποιητική δράση της E(spl)m7VP16 στον EE4 ενισχυτή.

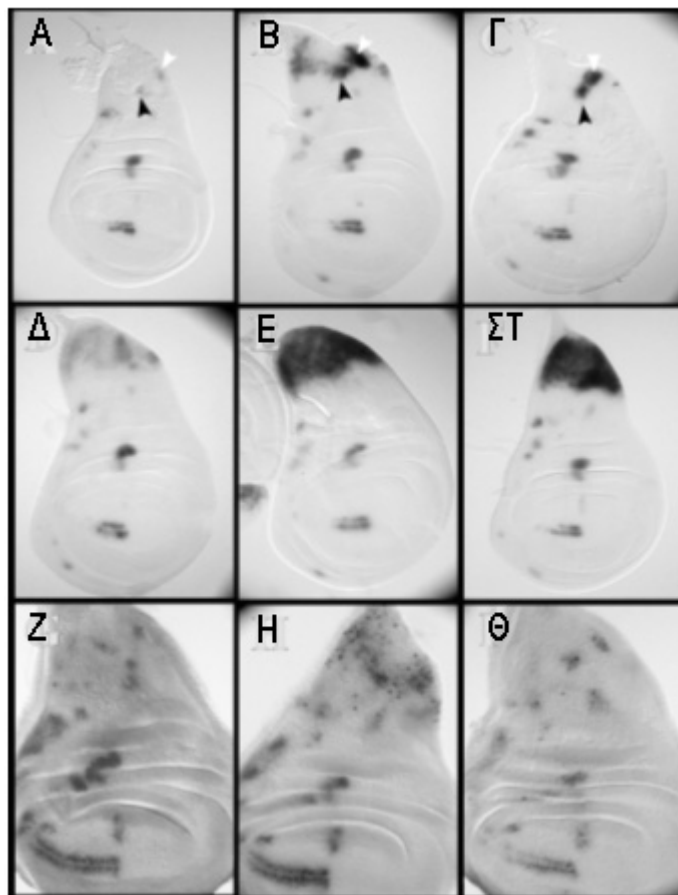
Εάν η E(spl)m7 στρατολογείται στον ενισχυτή μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με τις προνευρικές πρωτεΐνες, τότε η πρόσδεσή της στο DNA και επομένως η βασική της περιοχή είναι μη απαραίτητη. Η υπερέκφραση της E(spl)m7KNEQVP16, της μεταλλαγμένης μορφής της E(spl)m7VP16, οδήγησε σε ενεργοποίηση του EE4 ενισχυτή κατά πολύ παρόμοιο τρόπο με τη E(spl)m7VP16 (**Εικ. 14 Α-Γ**). Συνεπώς, η ικανότητα πρόσδεσης στο DNA δεν είναι απαραίτητη για την έμμεση πρόσβαση των E(spl) πρωτεϊνών στο DNA μέσω προνευρικών συμπλόκων, αν και πρέπει να σημειωθεί ότι η ενεργοποίηση του EE4 από την E(spl)m7KNEQVP16 περιορίστηκε μόνο στους προνευρικούς συναθροισμούς του αναπτυξιακού δίσκου σε αντίθεση με την επιπρόσθετη, εκτοπική ενεργοποίηση προκαλούμενη από την υπερέκφραση της E(spl)m7VP16 (**Εικ. 14 Β, Γ**). Το ίδιο ποιοτικά αποτέλεσμα παρατηρήθηκε μάλιστα όταν εξετάστηκε το ενδογενές πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *ac* (**Εικ. 14 Ζ-Θ**). Η εκτοπική ενεργοποίηση του *ac* από την E(spl)m7VP16 πιθανότατα οφείλεται στην πρόσδεση της υπερεκφραζόμενης πρωτεΐνης σε ενισχυτές που περιέχουν $E_{B/C}$ θέσεις πρόσδεσης. Η εκτοπικά παραγόμενη πρωτεΐνη Ac (και Sc) μπορεί να χρησιμεύει για την προσέλκυση της χιμαιρικής πρωτεΐνης E(spl)m7VP16 και την περαιτέρω ενίσχυση της έκφρασής της. Πάντως, η ταυτόχρονη υπερέκφραση Sc και E(spl)m7KNEQVP16 προκάλεσε ομοιόμορφη και καθολική έκφραση του EE4 ενισχυτή, όπως ακριβώς και η ταυτόχρονη υπερέκφραση Sc και E(spl)m7VP16, ενισχύοντας έτσι το συμπέρασμα ότι η διαθεσιμότητα και

η χωρική κατανομή των προνευρικών συμπλόκων είναι απαραίτητες παράμετροι για τη προσέλκυση των E(spl) πρωτεϊνών, ανεξάρτητα από την ικανότητα των τελευταίων να προσδένονται στο DNA (**Εικ. 14 Δ-ΣΤ**).

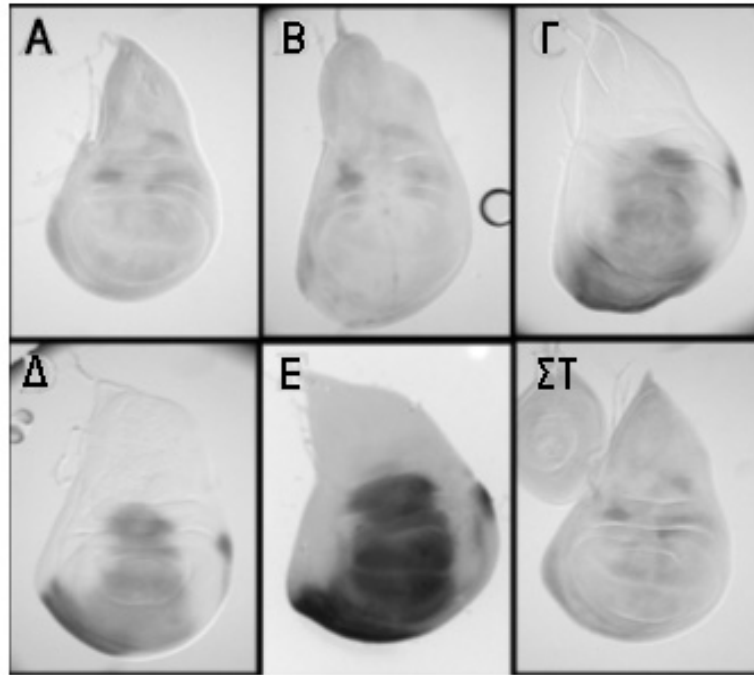
Δεδομένου των διαφορών που παρατηρήθηκαν στον *EE4* ενισχυτή, έπρεπε να πιστοποιηθεί η ενεργότητα των υπερεκφραζόμενων πρωτεϊνών σε έναν ενισχυτή, όπου στρατολογούνται μέσω DNA πρόσδεσης και στη ρύθμιση του οποίου οι προνευρικές πρωτεΐνες σε συμμετέχουν. Αυτός είναι ο *GbeB1* συνθετικός ενισχυτής, ο οποίος αποτελείται από θέσεις πρόσδεσης για τον καθολικά εκφραζόμενο στους αναπτυξιακούς δίσκους του φτερού ενεργοποιητή *Grainyhead* (*Grh*), καθώς και από βέλτιστες θέσεις πρόσδεσης για τις E(spl) πρωτεΐνες (Jennings et al. 1999). Η καθολική και ομοιόμορφη ενεργοποίησή του σε συνθήκες υπερέκφρασης των E(spl)m7VP16 και E(spl)mδVP16 απέδειξε την ενεργότητα των δύο χιμαιρικών πρωτεϊνών, ενώ όπως αναμενόταν η E(spl)m7VP16KNEQ δεν μπόρεσε να τον ενεργοποιήσει. Το πρότυπο έκφρασης ενός ενισχυτή που επιτρέπει την άμεση πρόσβαση των χιμαιρικών ενεργοποιητών είναι σαφέστατα διαφορετικό από το πρότυπο έκφρασης του *EE4* και αποδεικνύει ότι η δραστηριότητα της περιοχής VP16 δεν υπόκειται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Κατ' επέκταση η διαφορετική επίδραση των E(spl)m7VP16 και E(spl)mδVP16 στον *EE4* ενισχυτή οφείλεται στην διαφορετική ικανότητά τους να προσελκύονται στο DNA από τις προνευρικές πρωτεΐνες (**Εικ. 15**).



Εικόνα 13: Α) Η πειραματική μέθοδος που ακολουθήθηκε βασίστηκε στην μετατροπή των καταστολέων σε ενεργοποιητές. Εάν η μεταγραφική καταστολή είναι άμεση, τότε η μετατροπή τους σε ενεργοποιητές οδηγεί στην ενεργοποίηση της μεταγραφής (από Jimenez et al 1997). Β-Δ) Η εκτοπική υπερέκφραση των γονιδίων πραγματοποιήθηκε στην περιοχή έκφρασης του γονιδίου *omb*. Η εκτοπική υπερέκφραση του διαγονιδίου *E(spl)m7VP16* (Γ) προκαλεί ενεργοποίηση του *EE4-lacZ* σε προνευρικούς συναθροισμούς, όπου αυτό είναι ήδη ενεργό λόγω της έκφρασης των προνευρικών πρωτεϊνών (τα βέλη σε Β, που απεικονίζει αναπτυξιακούς δίσκους φτερού αγρίου τύπου, και Γ). Αντίθετα, η υπερέκφραση της *E(spl)mδVP16* (Δ) δεν έχει καμία επίπτωση στο πρότυπο έκφρασης του *EE4-lacZ*. Ε-ΣΤ) Αναπτυξιακοί δίσκοι στελεχών *sc¹⁰⁻¹*, στους οποίους η έλλειψη των προνευρικών γονιδίων *sc* και *ac* έχει ως αποτέλεσμα τη μη έκφραση του *EE4-lacZ* (Ε), ακόμα και σε συνθήκες υπερέκφρασης *E(spl)m7VP16* (ΣΤ). Η-Θ) Η υπερέκφραση του *sc* ενεργοποιεί τον *EE4-lacZ*, όπως αναμένεται, σχετικά ομοιόμορφα. Η συνέκφρασή του με *E(spl)m7VP16* προκαλεί εντονότερη και πιο ομοιόμορφη ενεργοποίηση του (Η-Θ).



Εικόνα 14: **A)** Αγρίου τύπου πρότυπο έκφρασης *EE4-lacZ* **B-Γ)** Η υπερέκφραση του *E(spl)m7KNEQVP16* (B) είναι έχει παρόμοια αποτελέσματα με την υπερέκφραση του *E(spl)m7VP16* (Γ) στους προνευρικούς συναθροισμούς (κεφαλές βελών), **Δ)** Η υπερέκφραση του *Sc* στη περιοχή έκφρασης του γονιδίου *rh* ενεργοποιεί την έκφραση του *EE4-lacZ*, **E-ΣΤ)** Η συνυπερέκφραση του *Sc* με *E(spl)m7KNEQVP16* (ΣΤ) ή *E(spl)m7VP16* (E) συνεπάγεται εντονότερη και πιο ομοιόμορφη ενεργοποίηση. **Z)** Αγρίου τύπου πρότυπο έκφρασης *achaete*, **H-Θ)** Η υπερέκφραση του *E(spl)m7VP16* (H) προκαλεί εκτοπική έκφραση του *ac*, όπως και του *EE4-lacZ* (B), το οποίο όμως δεν επιτυγχάνεται με την υπερέκφραση του *E(spl)m7KNEQVP16* (Θ).



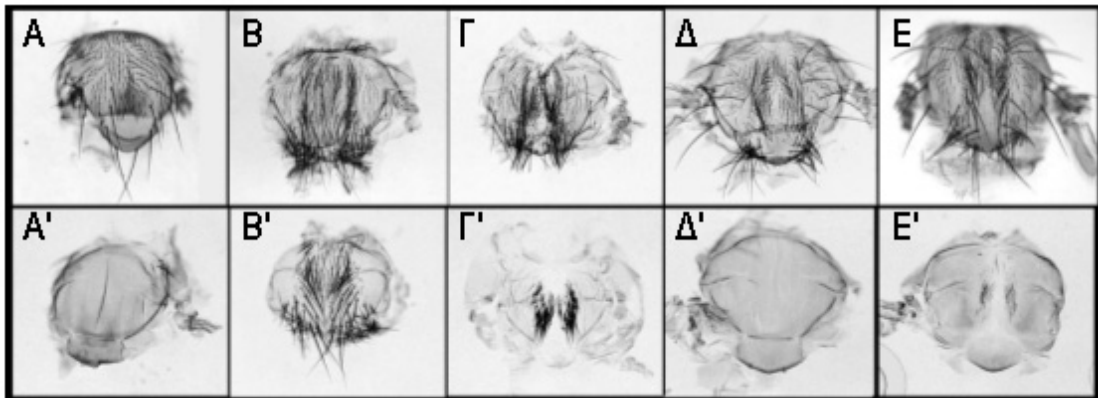
Εικόνα 15: Απόκριση του *GbeB1-lacZ* σε διάφορα διαγονίδια: Α) Αγρίου τύπου έκφραση, Β-ΣΤ) Υπερέκφραση του *Sc* (Β), *E(spl)m7VP16* (Γ), *E(spl)mδVP16* (Δ), *E(spl)mγVP16* (Ε), *E(spl)m7KNEQVP16* (ΣΤ).

5.4 Άμεση ή έμμεση πρόσδεση των πρωτεϊνών *E(spl)* σε γονίδια στόχους.

Είναι φανερό από τα παραπάνω ότι οι *E(spl)* πρωτεΐνες μπορούν και δρουν με ένα νέο τρόπο στην καταστολή της έκφρασης γονιδίων στόχων, ο οποίος επιτυγχάνεται με την προσέλκυση τους μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων από προνευρικά σύμπλοκα, ήδη προσδεδεμένα στο DNA. Είναι όμως απαραίτητο να τονιστεί ότι ο νέος αυτός τρόπος δράσης των *E(spl)* δεν είναι ο μόνος. Έχει ήδη αναφερθεί η ικανότητά τους να προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες και να δρουν ως άμεσοι μεταγραφικοί καταστολείς μέσω της προσέλκυσης του συγκαταστολέα Groucho. Η ιδιότητά τους αυτή είναι άμεσα συνδεδεμένη με το γεγονός ότι η βασική περιοχή των *E(spl)* πρωτεϊνών, που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεσή τους στο DNA είναι εξελικτικά συντηρημένη. Ποιος είναι όμως εν τέλει ο τρόπος με τον οποίο οι *E(spl)* πρωτεΐνες δρουν *in vivo*; Η ερώτηση αυτή προσεγγίστηκε με την εξέταση της ικανότητας των διαφόρων χιμαιρικών *E(spl)VP16* πρωτεϊνών να ενεργοποιήσουν τα γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων, όπως αυτή απεικονίζεται από το πρότυπο των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων στο θώρακα των ενήλικων ατόμων, αν αποτραπεί ο ένας από τους δύο τρόπους στρατολόγησής τους, δηλαδή η αλληλεπίδραση με τις προνευρικές πρωτεΐνες.

Οι χιμαιρικές *E(spl)VP16* πρωτεΐνες είχαν την ικανότητα να προάγουν τη ανάπτυξη εκτοπικών σμηρίγγων στο θώρακα ατόμων αγρίου τύπου (Εικ. 16 Γ-Ε), αφού η απευθείας δράση των *E(spl)m7VP16* και *E(spl)mδVP16* σε γονίδια-στόχους των προνευρικών γονιδίων

προκαλεί την δημιουργία εκτοπικών σμηρίγγων ακόμα και στο θώρακα ενήλικων ατόμων sc^{10-1} (Εικ. 16 Γ', Ε'). Η δράση τους οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην ικανότητά τους να προσδένονται στο DNA, αφού η χιμαιρική πρωτεΐνη E(spl)m7KNEQVP16, που μπορεί να δρα μόνο μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, είναι λιγότερο αποτελεσματική από την E(spl)m7VP16 σε αγρίου τύπου γενετικό υπόβαθρο και τελείως ανενεργή όταν εκλείπει η ενεργότητα των προνευρικών γονιδίων (Εικ. 16 Γ-Γ', Δ-Δ'). Πρέπει όμως να τονιστεί η συνέργεια μεταξύ E(spl)m7VP16 και προνευρικών, καθώς η συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι πιο ενεργή από την E(spl)mδVP16 (Εικ. 16 Γ-Γ', Ε-Ε').



Εικόνα 16: Επίδραση της υπερέκφρασης διάφορων χιμαιρικών E(spl)VP16 πρωτεϊνών στο πρότυπο των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων στο θώρακα ενήλικων ατόμων, σε αγρίου τύπου γενετικό υπόστρωμα (A-E) ή υπό συνθήκες έλλειψης των ενδογενών *ac* και *sc* (σε sc^{10-1} άτομα) (A'-E'). A-A') Καμμία υπερέκφραση B-B') Υπερέκφραση *Sc* Γ-Γ') Υπερέκφραση E(spl)m7VP16, Δ-Δ') Υπερέκφραση E(spl)m7KNEQVP16, Ε-Ε') Υπερέκφραση E(spl)mδVP16.

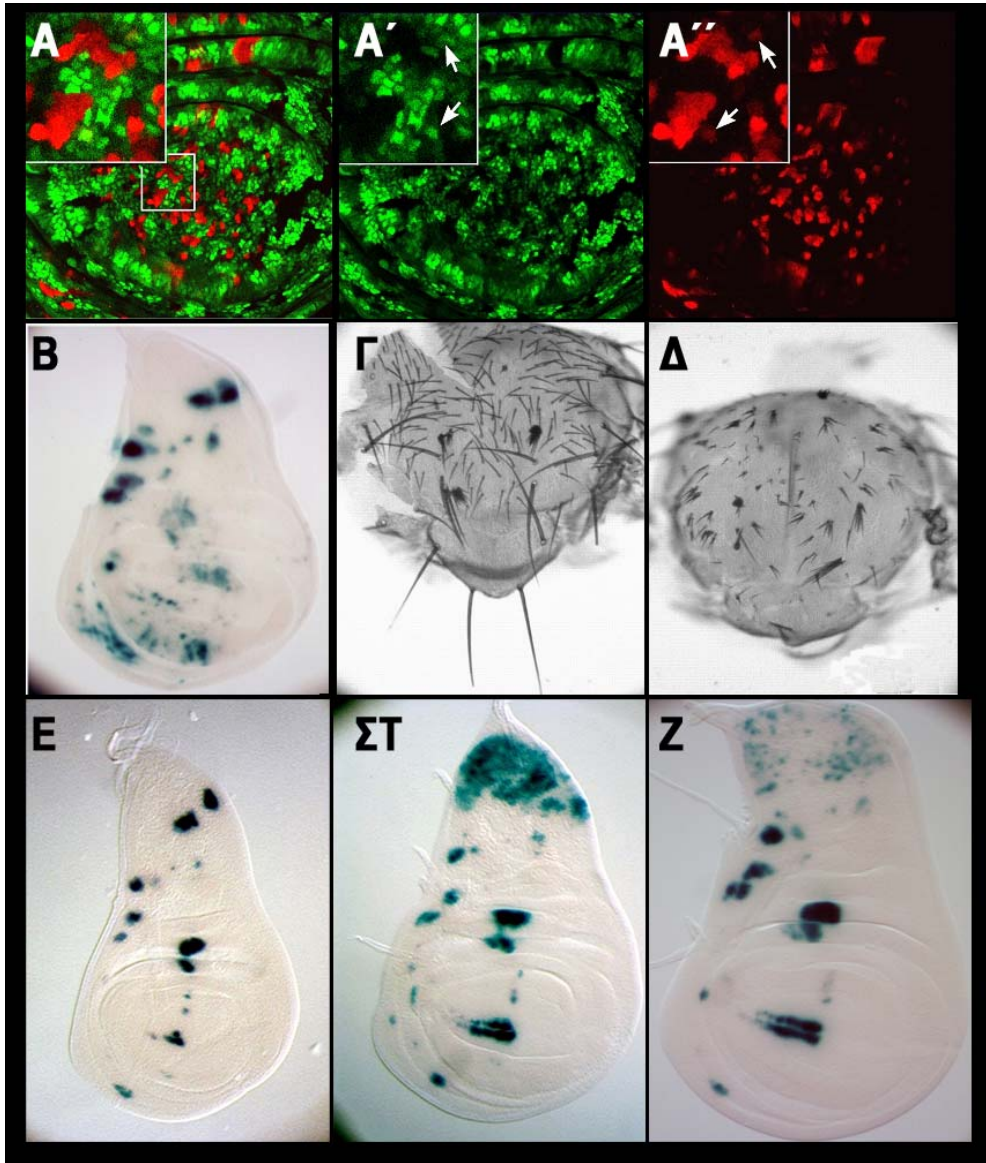
5.5 Η καταστολή της μεταγραφής από την E(spl)m7 απαιτεί τον συγκαταστολέα Groucho.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι έως τώρα γνωστό ότι οι E(spl) πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με το συγκαταστολέα Groucho για να καταστείλουν τη μεταγραφή γονιδίων στόχων. Υπάρχει όμως η πιθανότητα ο μηχανισμός καταστολής από τη E(spl)m7, όταν αυτή προσελκύεται από τα προνευρικά σύμπλοκα, να είναι διαφορετικός. Πιο συγκεκριμένα, είναι πιθανό η αλληλεπίδραση μεταξύ των ενεργοποιητών και του καταστολέα να αποκλείει την αλληλεπίδραση της ενεργοποιητικής περιοχής των πρώτων με τη βασική μεταγραφική μηχανή και να καταργεί τη δράση της. Αντιθέτως, εάν η απαίτηση για το συγκαταστολέα Groucho εξακολουθεί να υφίσταται τότε η έμμεση πρόσβαση των E(spl) πρωτεϊνών σε αλληλουχίες στόχους θα έχει τον ίδιο τρόπο ενεργού καταστολής με τις περιπτώσεις όπου οι E(spl) πρωτεΐνες έχουν άμεση πρόσδεση στο DNA.

Η απαίτηση για την πρωτεΐνη Groucho εξακριβώθηκε με πολλαπλούς τρόπους (**Εικ. 17**). Ένας από αυτούς ήταν η επαγωγή μιτωτικών κλώνων κυττάρων, ομόζυγων για ένα μεταλλαγμένο αλληλόμορφο πλήρους έλλειψης λειτουργίας του γονιδίου *groucho*, το *gro*^{E48}, σε περιοχές του αναπτυξιακού δίσκου του φτερού, όπου υπερέκφράστηκαν ταυτόχρονα οι πρωτεΐνες Sc και E(spl)m7. Εφόσον είναι γνωστό ότι η παραπάνω συνθήκες υπερέκφρασης έχουν ως αποτέλεσμα την καταστολή του *EE4-lacZ*, λόγω της προσέλκυσης του καταστολέα στα προνευρικά σύμπλοκα, ο απώτερος σκοπός ήταν να συγκριθεί η απόκριση του *EE4* ενισχυτή μέσα στους μιτωτικούς κλώνους με περιοχές ενός δίσκου, στις οποίες η ενεργότητα του γονιδίου *groucho* είναι παρούσα. Πράγματι, παρατηρήθηκε έντονη αποκαταστολή του *EE4* ενισχυτή μέσα σε μιτωτικούς κλώνους, το οποίο συνεπάγεται ότι οι E(spl) πρωτεΐνες επιστρατεύουν την Groucho πρωτεΐνη για την κατασταλτική τους λειτουργία, ακόμη και όταν στρατολογούνται μέσω διαπρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, όπως στην περίπτωση του *EE4-lacZ* (**Εικ. 17 A-A", B**). Παρομοίως, η επαγωγή μιτωτικών κλώνων με έλλειψη λειτουργίας *groucho* όχι μόνο αποτρέπει την καταστολή σμηρίγγων που έχει επιβάλλει η E(spl)m7 αλλά επιπλέον παράγονται τούφες εκτοπικών σμηρίγγων υποδηλώνοντας αποτροπή της πλευρικής αναστολής (**Εικ. 17 Γ, Δ**). Επίσης, υπερέκφραση της E(spl)m7ΔW, μιας μεταλλαγμένης μορφής της E(spl)m7, ανίκανης να αλληλεπιδράσει με Groucho, δεν έχει καμμία επίδραση είτε στην ενεργότητα του *EE4-lacZ* (**Εικ. 17 E - Z**) είτε στο πρότυπο των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων.

Το συμπέρασμα που εξάγεται είναι ότι η πρωτεΐνη Groucho είναι πάντα απαραίτητη για την κατασταλτική δράση της E(spl)m7 πρωτεΐνης, ανεξάρτητα με τον τρόπο με τον οποίο η

τελευταία στρατολογείται στον ενισχυτή. Επιβεβαιώνει μάλιστα ότι οι *E(spl)m7* πρωτεΐνες ποτέ δε δρουν μέσω της απομάκρυνσης των ενεργοποιητών από το DNA, αφού ένας τέτοιος τρόπος δράσης θα καταστούσε το συγκαταστολέα *Groucho* περιττό.



Εικόνα 17: A-A'') Σε γενετικό υπόβαθρο υπερέκφρασης *sc* και *E(spl)m7* και κλώνους κυττάρων, ομόζυγων για τη μεταλλαγή έλλειψης λειτουργίας *groE48*, αρνητικά χρωματισμένων για τη παρουσία του αντιγόνου *myc* (η οποία μαρτυρά με την ύπαρξη φυσιολογικού αλληλόμορφου *groucho*) η έντονη κόκκινη χρώση αντανάκλα την αποκαταστολή του *EE4-lacZ*. **B)** Η καταστολή του *EE4-lacZ* στο συγκεκριμένο σύστημα δεν είναι άλλωστε πλήρης από τη συνυπερέκφραση *Sc* και *E(spl)m7* (επίσης βέλη στο **A'** και **A''**). **Γ-Δ)** Σε θώρακες ενήλικων ατόμων που φέρουν κλώνους κυττάρων με έλλειψη *groucho*, αναπτύσσονται θύσσανοι από σμήριγγες, αντιπροσωπεύοντας την κατάρρευση της πλευρικής αναστολής, ακόμα και όταν υπερεκφράζεται *E(spl)m7* στη περιοχή του γονιδίου *apterous* (**Δ**). **E-Z)** Η υπερέκφραση του *E(spl)m7ΔW* (στη περιοχή του γονιδίου *rho*), είτε μόνο του (**E**) είτε μαζί με *Sc* (**ΣΤ**) δεν έχει καμμία επίδραση στο πρότυπο του *EE4-lacZ* (σύγκριση του **E** με αγρίου τύπου πρότυπο έκφρασης της Εικόνας 4A και του **ΣΤ** με **Ζ**, που αντιστοιχεί σε συνυπερέκφραση *Sc* και *E(spl)m7*).

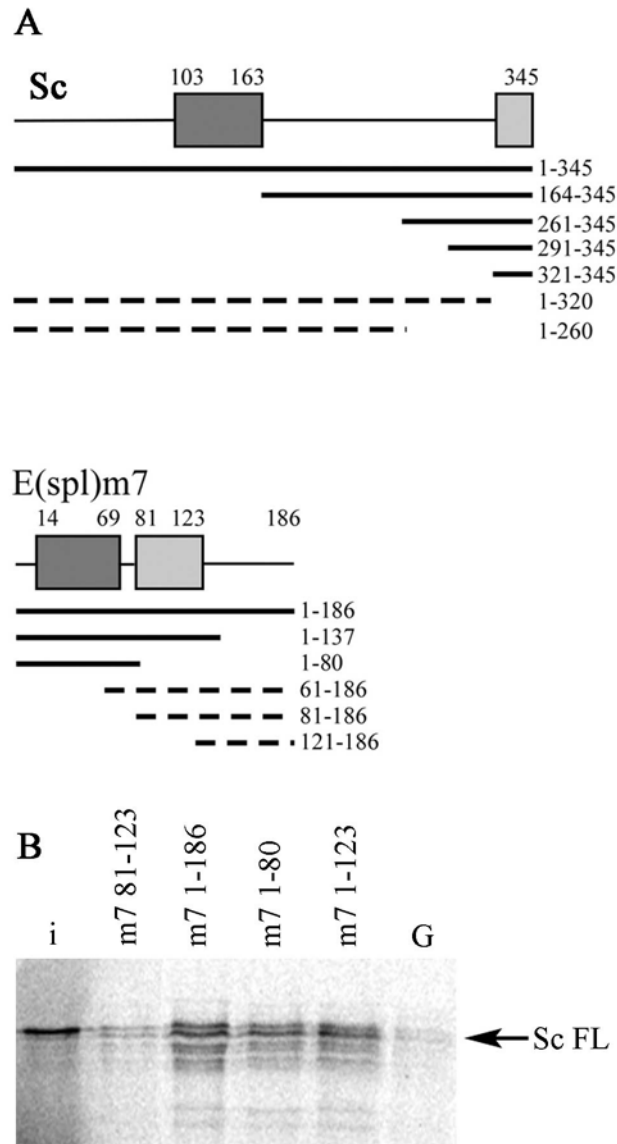
5.6 Ταυτοποίηση των περιοχών αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών Sc και E(spl)m7.

Η χαρτογράφηση των περιοχών αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών επιτεύχθηκε αρχικά με την μέθοδο αλληλεπίδρασης των δύο υβριδίων στο μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Πιο συγκεκριμένα, τμήματα των δύο γονιδίων συντήχθηκαν είτε με την LexA ετερόλογη περιοχή πρόσδεσης στο DNA είτε με την B42 ετερόλογη περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής. Η πλήρης σειρά των αλληλεπιδράσεων φαίνεται στον **Πίν. 3**. Η πλήρους έκτασης συντηγμένη πρωτεΐνη B42-Scute αλληλεπιδρά με όλες τις LexA υβριδικές μορφές της E(spl)m7, που ταυτόχρονα συμπεριλάμβαναν την N-τελική περιοχή της. Αντιστρόφως, οι αμινοτελικές περιοχές της E(spl)m7 αλληλεπιδρούσαν με τις υβριδικές μορφές της Sc που εμπεριείχαν την καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης. Συμπερασματικά, τα τελευταία 25 αμινοξέα της πρωτεΐνης Sc και τα 80 αμινοτελικά αμινοξέα της πρωτεΐνης E(spl)m7 συνιστούν τις ελάχιστες απαιτούμενες περιοχές για την μεταξύ τους αλληλεπίδραση (**Εικ. 18 Α**).

Η αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών και των επιμέρους περιοχών τους επιβεβαιώθηκε με πειράματα αλληλεπίδρασης *in vitro*. Η πρωτεΐνη E(spl)m7 ή τμήματα αυτής υπερεκφράστηκαν ως GST πρωτεΐνες σε βακτήρια και μετά τον καθαρισμό τους χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα για την πρόσδεση ραδιοσημασμένης πρωτεΐνης Sc, που παρήχθη με *in vitro* μεταγραφή και μετάφραση χρησιμοποιώντας λύμα δικτυοκύτταρων κουνελιού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η πρωτεΐνη Sc κατακρατείται μόνο από τμήματα της πρωτεΐνης E(spl)m7 που συμπεριλαμβάνουν την αμινοτελική bHLH περιοχή της (**Εικ. 18 Β**). Πρέπει να σημειωθεί ότι το παραπάνω πείραμα όχι μόνο επιβεβαίωσε την αλληλεπίδραση των προαναφερόμενων περιοχών των πρωτεϊνών αλλά περαιτέρω υποδεικνύει ότι η αλληλεπίδραση αυτή είναι κατά πάσα πιθανότητα άμεση. Το συμπέρασμα της άμεσης αλληλεπίδρασης ενισχύεται και από την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Da/Sc/E(spl)m7, συμμεταφρασμένων *in vitro*, για το σχηματισμό ενός ολιγομερούς πρωτεϊνικού συμπλέγματος πάνω σε ακινητοποιημένο EA ολιγονουκλεοτίδιο (αποτελέσματα Κωστή Κουμπανάκη από Giagtzoglou et al 2004, υποβεβλημένο για δημοσίευση).

Πίνακας 3: Αλληλεπιδράσεις διαφόρων τμημάτων των Sc και E(spl)m7 σε σύστημα δύο υβριδίων στο ζαχαρομύκητα. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε αμινοξέα της αντίστοιχης πρωτεϊνικής ακολουθίας. Όλες οι αλληλεπιδράσεις εκτιμήθηκαν ποιοτικά με βάση το χρώμα που αναπτυσσόταν σε στερεές καλλιέργειες 24 ωρών σε θρεπτικό μέσο που περιείχε X-gal, ως υπόστρωμα της lacZ. ++: έντονο χρώμα - δυνατή αλληλεπίδραση, + : λιγότερο έντονο χρώμα - ασθενής αλληλεπίδραση, -: καθόλου χρώμα - καθόλου αλληλεπίδραση, Δ.Ε.: δεν εξετάστηκε, FL: πλήρους έκτασης. Ως αλληλεπιδράσεις ελέγχου θεωρήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του Groucho, που είναι συζευγμένο με την ενεργοποιητική περιοχή VP16, αντί της B42 (Alifragis et al 1997), και των καρβοξυτελικών κομματιών του E(spl)m7 (Paroush et al., 1994) και οι αλληλεπιδράσεις των bHLH περιοχών της Sc με τη bHLH (551-710) περιοχή της Da (Murre et al 1989). Αν και οι περιοχές E(spl)m7 1-80 και Sc 321-345 είναι οι ελάχιστες περιοχές αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο πρωτεϊνών, η μεταξύ τους αλληλεπίδραση δεν ανιχνεύεται (#), πιθανότατα λόγω των χαμηλών επιπέδων έκφρασής τους ή της αστάθειάς των δύο επιμέρους συντηγμένων πρωτεϊνών .

	LexA	Πλασμιδιακός φορέας	m7 1-186 (FL)	m7 1-137	m7 1-80 *	m7 61-186	m7 81-186	m7 121-186	Da 551-710
B42									
Πλασμιδιακός φορέας		Δ.Ε.	-	-	-	-	-	-	-
Sc 1-345 (FL)		-	++	++	++	-	-	-	++
Sc 1-320		-	+	-	-	+	-	-	++
Sc 1-260		-	+	-	-	+	+	-	++
Sc 164-345		-	++	++	+	-	-	-	-
Sc 261-345		-	++	++	+	-	-	-	-
Sc 291-345		-	++	++	+	-	-	-	-
Sc 321-345*		-	+	++	-#	-	-	-	-
Gro-VP16		-	++	-	-	++	++	++	Δ.Ε.

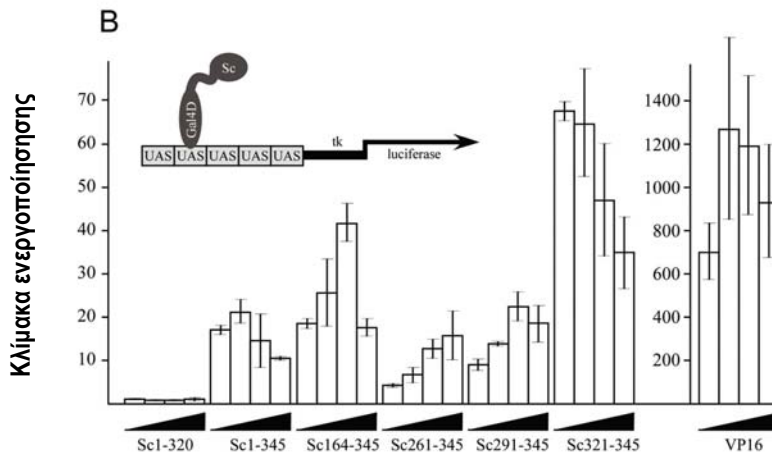
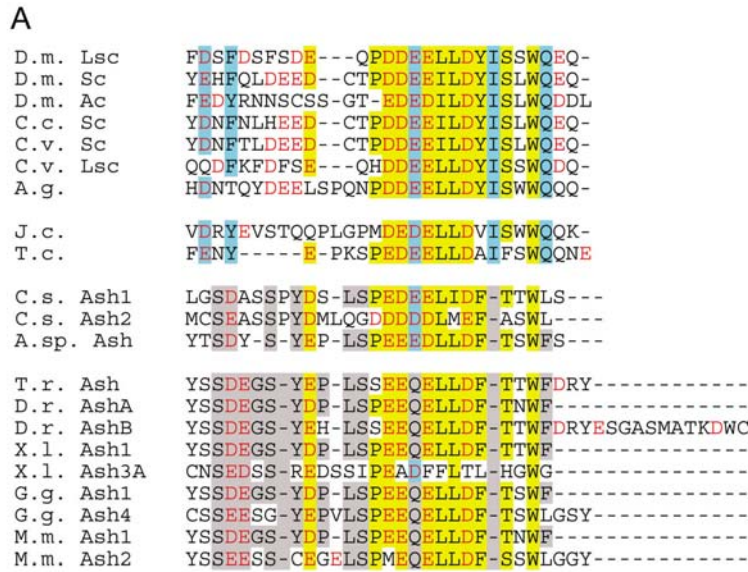


Εικόνα 18: A) Σχεδιάγραμμα αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφόρων τμημάτων των πρωτεϊνών Sc και E(spl)m7, βασισμένο στην εξέτασή τους στο σύστημα δύο υβριδίων (Πίν. 3). Οι συνεχείς γραμμές αντιστοιχούν στα τμήματα των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν θετικά, ενώ οι διακεκομμένες γραμμές αντιστοιχούν στα τμήματα των πρωτεϊνών που δεν αλληλεπιδρούν καθόλου. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στα αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης. Τα παραλληλόγραμμα με σκούρο χρώμα αντιστοιχούν στις bHLH περιοχές των πρωτεϊνών, ενώ αυτά με ανοιχτό γκρι χρώμα αντιστοιχούν στο όξινο καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης Sc και στην περιοχή Orange της E(spl)m7, **B)** SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων αλληλεπίδρασης μεταξύ GST - πρωτεϊνικών τμημάτων της E(spl)m7 και ραδιοσημασμένης, *in vitro* μεταφρασμένης Sc. Μόνο τα αμινοτελικά κομμάτια της E(spl)m7 αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Sc. i: 1/5 της αντίδρασης της *in vitro* μετάφρασης, ως δείγμα αναφοράς, G: GST πρωτεΐνη, ως αρνητικό δείγμα ελέγχου.

5.7 Το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης Scute είναι περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής.

Η σύγκριση της αλληλουχίας της καρβοξυτελικής περιοχής της πρωτεΐνης Scute με πρωτεΐνες μέλη του *Achaete-Scute* συναθροισμού καθώς και με ομόλογες πρωτεΐνες προερχόμενες από άλλα είδη αποκάλυψε ότι είναι συντηρημένη εξελικτικά σε μεγάλο βαθμό (Εικ. 19 Α). Ιδιαίτερα η παρουσία έξι όξινων αμινοξέων υποδηλώνει ότι η περιοχή αυτή μπορεί να αποτελεί περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής. Για τη διερεύνηση αυτής της πιθανότητας, η πρωτεΐνη Sc και τμήματα αυτής συντήχθησαν με την ετερόλογη GAL4 περιοχή πρόσδεσης στο DNA με σκοπό να εξεταστεί η ικανότητά των χιμαιρικών μορίων να ενεργοποιήσουν την έκφραση του γονιδίου ανταποκριτή της λουσιφεράσης, όταν αυτή ελέγχεται από τον ελάχιστο υποκινητή του γονιδίου της κινάσης της θυμιδίνης συνδεδεμένο με GAL4 θέσεις πρόσδεσης, σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης S2 κυττάρων.

Όλα τα χιμαιρικά μόρια που περιέχουν τα 25 καρβοξυτελικά αμινοξέα της πρωτεΐνης Scute (αμινοξικά κατάλοιπα 321-345) ενεργοποιούν την έκφραση του γονιδίου ανταποκριτή αναφοράς (Εικ. 19 Β). Το πιο ενεργό είναι μάλιστα το μικρό σε μέγεθος καρβοξυτελικό τμήμα της Sc, το οποίο ενεργοποίησε την έκφραση της λουσιφεράσης έως και 68 φορές περισσότερο από τα βασικά επίπεδα δραστηριότητας. Όποια μόρια δε περιείχαν την περιοχή αυτή, συμπεριλαμβανομένου και του σχεδόν πλήρους μήκους μορίου Scute₁₋₃₂₀, δεν μπόρεσαν να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς, αν και αποδεδειγμένα εκφράζονται, αφού λύματα των κυττάρων αυτών επιδεικνύουν δραστηριότητα πρόσδεσης σε UAS ολιγονουκλεοτίδιο σε πειράματα υστέρησης ηλεκτροφορητικής κινητικότητας (αποτελέσματα Κωστή Κουμπανάκη από Giagtzoglou et al 2004, υποβεβλημένο για δημοσίευση). Άρα, τα 25 αμινοξέα της καρβοξυτελικής περιοχής της πρωτεΐνης Sc αποτελούν, πιθανότατα τη μόνη, την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής.



Εικόνα 19: A) Πολλαπλή στοίχιση (με χρήση του προγράμματος ClustalW 1.5) των καρβοξυτελικών πρωτεϊνικών αλληλουχιών των διαφόρων ομόλογων προνευρικών πρωτεϊνών (στις παρενθέσεις βρίσκονται οι αριθμοί πρόσβασης από τη βάση δεδομένων) από τα ακόλουθα δίπτερα: *Drosophila melanogaster* (D.m.) [P10084, P09774, P10083], *Calliphora vicina* (C.v.) [AAL32067, AAL32066], *Ceratitis capitata* (C.c.) [AAF66944], *Anopheles gambiae* (A.g.) [AAK97461], από άλλα έντομα: *Junonia coenia* (J.c.) [AAC24714] και *Tribolium castaneum* (T.c.) [AAQ23386], από την αράχνη *Cupiennius salei* (C.s.) [CSA309490, CAC27517] και το μυριάποδο *Archispirostreptus*. sp. (A. sp.) [CAD60436], καθώς και από τα ακόλουθα σπονδυλωτά: *Takifugu rubripes* (T.r.) [AAB88278], *Danio rerio* (D.r.) [NP_571294, NP_571306], *Xenopus laevis* (X.l.) [Q06234, AAK14425], *Gallus gallus* (G.g.) [I51382, AAC60096] και *Mus musculus* (M.m.) [BC055748, O35885]. Με κίτρινο φόντο σημειώνονται τα αμινοξικά κατάλοιπα που είναι παρόμοια σε όλα τα είδη, με μπλε φόντο σημειώνονται τα αμινοξικά κατάλοιπα που είναι παρόμοια στα έντομα και με γκρι φόντο σημειώνονται αυτά που είναι παρόμοια στα σπονδυλωτά. Με κόκκινο χρώμα σημειώνονται τα κατάλοιπα που είναι όξινα. **B)** Κλίμακα ενεργοποίησης του γονιδίου αναφοράς UAS-tk-luc, με μονάδα βάσης την ενεργοποίηση του κενού πλασμιδιακού φορέα, από αυξανόμενες ποσότητες (20, 50, 100 and 200ng ανά αντίδραση διαμόλυνσης) των επιδεικνυόμενων Gal4Sc και Gal4VP16 χιμαιρικών μορφών.

5.8 Η περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής της πρωτεΐνης Sc καταστέλλεται από τις πρωτεΐνες E(spl).

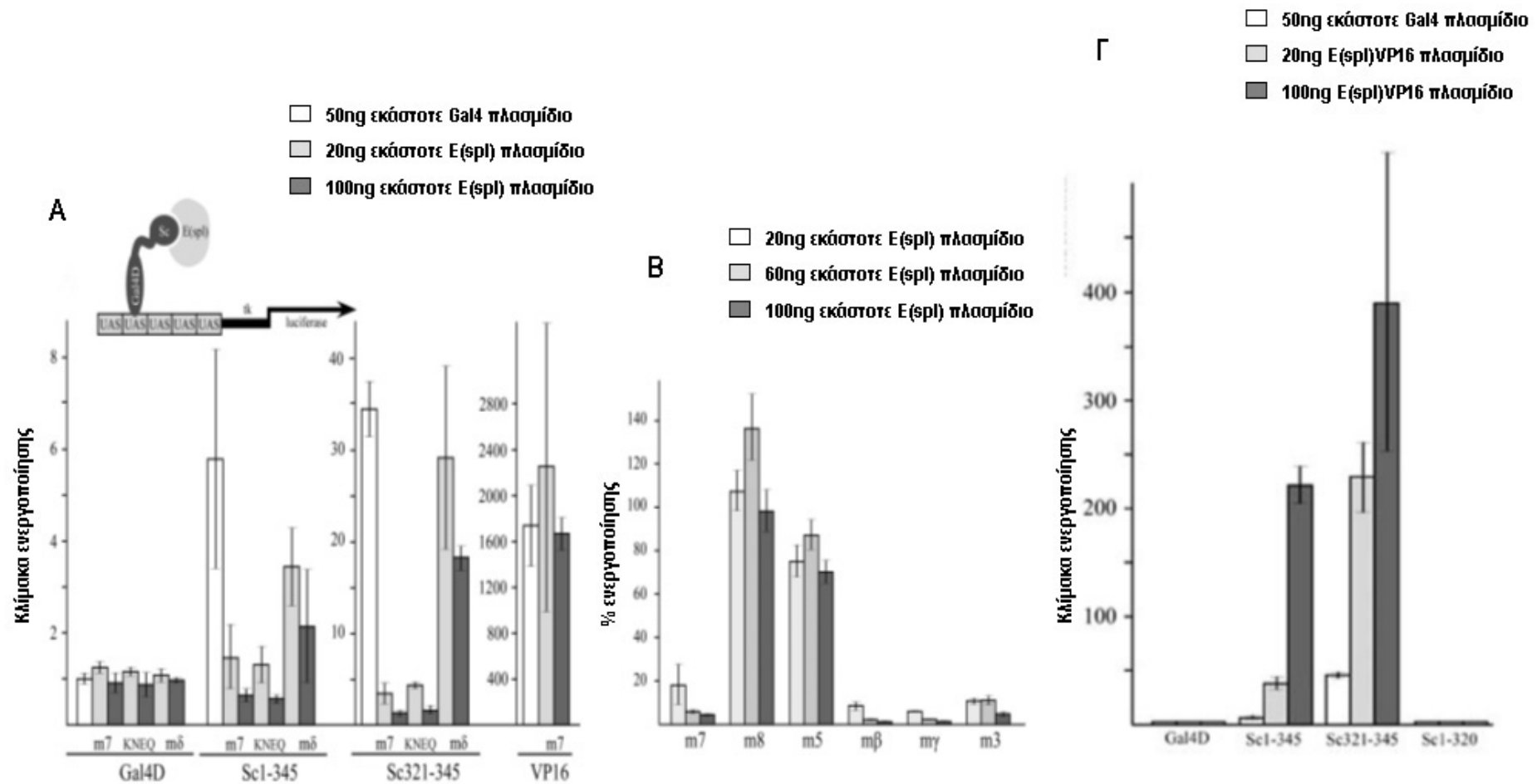
Η στρατολόγηση των E(spl) πρωτεϊνών από τις προνευρικές πρωτεΐνες *in vivo* και η επακόλουθη καταστολή γονιδίων στόχων θα μπορούσε να πραγματοποιείται μέσω της αλληλεπίδρασης τους με την περιοχή ενεργοποίησης Sc. Προς επιβεβαίωση της παραπάνω υπόθεσης, εξετάστηκε η επίδραση της E(spl)^{m7} πρωτεΐνης στην ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς της λουσιφεράσης από χιμαιρικά μόρια GAL4Sc₁₋₃₄₅ και GAL4Sc₃₂₁₋₃₄₅ σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης S2 κυττάρων.

Όπως αναμενόταν, η E(spl)^{m7} κατέστειλε πλήρως την ενεργοποίηση του γονιδίου ανταποκριτή από τα χιμαιρικά μόρια GAL4Sc₁₋₃₄₅ και GAL4Sc₃₂₁₋₃₄₅, επαναφέροντάς την στα βασικά επίπεδα. Η καταστολή ήταν δραματική σε όλες τις περιπτώσεις. Αντίθετα, ως αρνητικό δείγμα ελέγχου, καταστολή δεν παρατηρήθηκε όταν η έκφραση του γονιδίου αναφοράς ενεργοποιήθηκε (περίπου 1240 φορές παραπάνω από τα βασικά επίπεδα έκφρασης) από το χιμαιρικό μόριο GAL4VP16 (**Εικ. 20 Α**).

Η καταστολή του γονιδίου αναφοράς επιτεύχθηκε ακόμα και όταν τα S2 κύτταρα διαμολύνθηκαν με τη μεταλλαγμένη μορφή της E(spl)^{m7}, την E(spl)^{m7}KNEQ, που ως γνωστόν δεν έχει ικανότητα πρόσδεσης στο DNA τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, αλλά μπορεί να αλληλεπιδάσει με την πρωτεΐνη Sc (**Εικ. 20 Α**). Αντίθετα, η πρωτεΐνη E(spl)^{mδ}, η οποία, ενώ έχει ακέραια την bHLH περιοχή της και άρα μπορεί να προσδεθεί στο DNA, δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με πρωτεΐνη Sc, δεν είναι ικανή να καταστείλλει την έκφραση του γονιδίου αναφοράς, παρά μόνο ασθενώς, όταν χρησιμοποιούνται σημαντικές ποσότητες του ανάλογου πλασμιδίου έκφρασης για τη διαμόλυνση των κυττάρων (**Εικ. 20 Α**). Είναι μάλιστα χαρακτηριστικό το γεγονός ότι, όπως και η E(spl)^{mδ}, οι E(spl)^{m8} και ^{m5} πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν δειχθεί ότι δεν αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Sc σε σύστημα δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα επίσης δεν είναι ικανές να καταστείλουν την ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες E(spl)^{m3}, ^{mγ} και ^{mβ} δρουν παρόμοια με την E(spl)^{m7} (αποτελέσματα John Fullard από Giagtzoglou et al 2004, υποβεβλημένο για δημοσίευση) (**Εικ. 20 Β**). Η κατηγοριοποίηση των E(spl) πρωτεϊνών βάσει των αλληλεπιδράσεών τους με τη πρωτεΐνη Sc (Alifragis et al 1997) επιβεβαιώνεται με βάση την δραστηκότητά τους, τονίζοντας με αυτόν τον τρόπο την αλληλεξάρτηση μεταξύ των δύο ιδιοτήτων τους.

Εφόσον η αλληλεπίδραση της E(spl)^{m7} με την περιοχή ενεργοποίησης της Sc είναι υπεύθυνη για την έμμεση πρόσδεσή της στο DNA τότε η (προαναφερθείσα) χιμαιρική πρωτεΐνη E(spl)^{m7}VP16 θα έπρεπε να είναι ικανή να αυξήσει την ενεργοποίηση του γονιδίου

αναφοράς της λουσιφεράσης, όταν συνεκφράζεται με τις GAL4Sc₁₋₃₄₅ και GAL4Sc₃₂₁₋₃₄₅ πρωτεΐνες σε S2 κύτταρα διαμολυσμένα με τα ανάλογα πλασμίδια έκφρασης. Η ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς που πραγματικά παρατηρήθηκε ουσιαστικά έχει πολλαπλασιαστεί και σημαντικότερα, είναι απόλυτα εξαρτημένη από την παρουσία των «αρχικών» ενεργοποιητών GAL4Sc₁₋₃₄₅ και GAL4Sc₃₂₁₋₃₄₅ (**Εικόνα 20 Γ**). Πρέπει λοιπόν να τονιστεί ότι οι E(spl) πρωτεΐνες δεν αλληλεπιδρούν με την GAL4 περιοχή των χιμαιρικών μορίων. Η πρωτεΐνη GAL4Sc₁₋₃₂₀ δεν μπορεί να προσελκύσει την E(spl) m7VP16 και να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή της λουσιφεράσης (**Εικόνα 20 Γ**). Η καταστολή που παρατηρήθηκε στα προηγούμενα πειράματα δεν μπορεί να βασιστεί σε μία τέτοια υποτιθέμενη αλληλεπίδραση που μπορεί να συνεπαγόταν την ελάττωση της ικανότητας πρόσδεσης των GALSc χιμαιρικών μορίων σε UAS αλληλουχίες. Για την περαιτέρω επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής, διεξήχθησαν πειράματα υστέρησης ηλεκτροφορητικής κινητικότητας με λύματα από S2 κύτταρα, όπου ανιχνεύτηκε δραστικότητα πρόσδεσης των χιμαιρικών μορίων Gal4Sc(321-345) σε ραδιοσημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο, ενώ συνεκφράζονται με E(spl)m7 (αποτελέσματα Κουμπανάκη Κωστή από Giagtzoglou et al 2004, υποβεβλημένο για δημοσίευση).



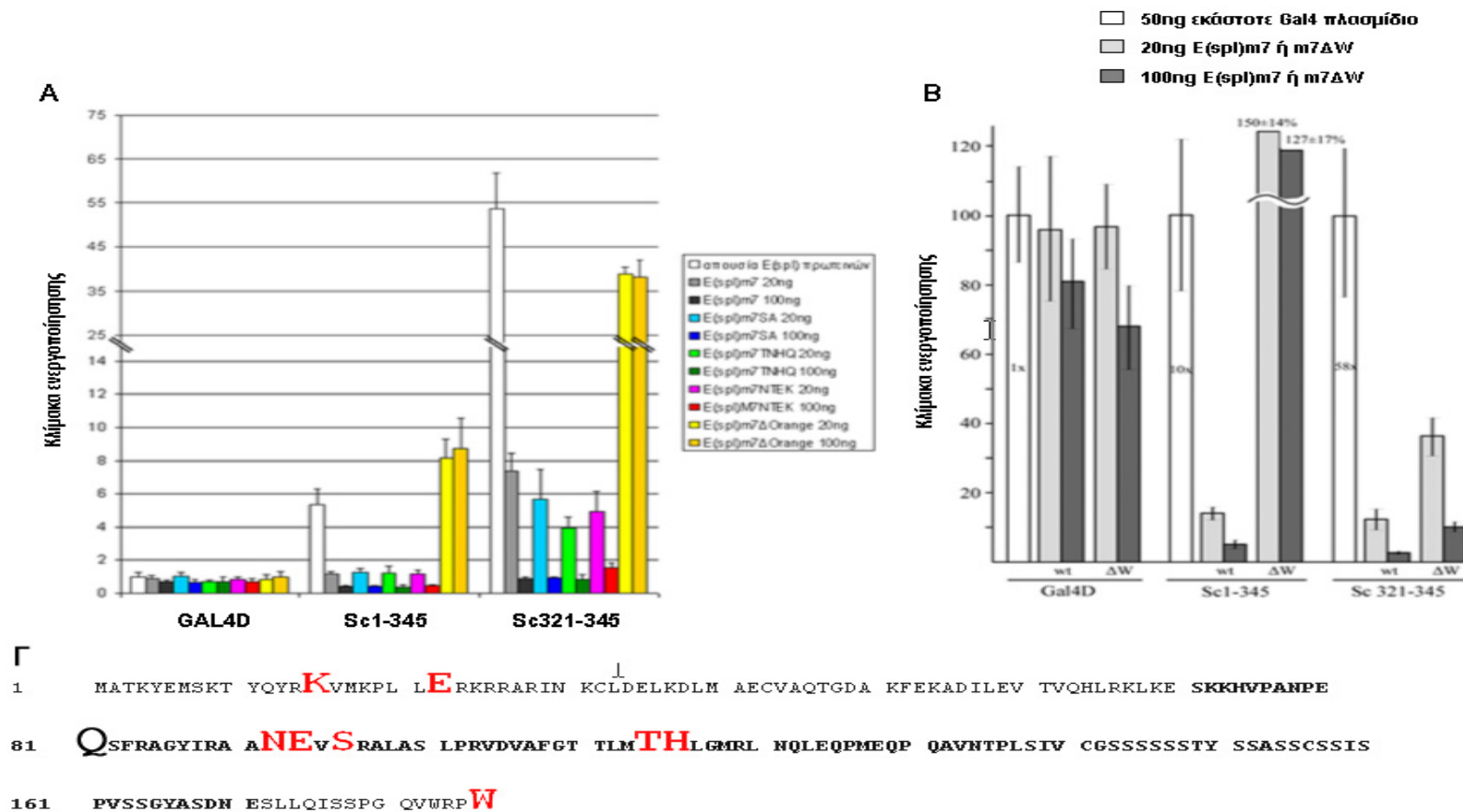
Εικόνα 20: **A)** Επίδραση των *E(spl)m7*, *E(spl)m7KNEQ* και *E(spl)mδ* στην κλίμακα ενεργοποίησης του γονιδίου αναφοράς *UAS-tk-luc* από τον κενό Gal4 πλασμιδιακό φορέα (Gal4D) ή τις πρωτεΐνες Gal4Sc1-345, Gal4Sc321-345 και Gal4VP16, **B)** Ποσοτικοποιημένη % επίδραση των διάφορων *E(spl)* πρωτεϊνών στην ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς από Gal4Sc321-345 (100% ενεργοποίηση), **Γ)** Επίδραση του *E(spl)m7VP16* στην κλίμακα ενεργοποίησης του γονιδίου αναφοράς από το κενό Gal4 πλασμιδιακό φορέα ή από τις πρωτεΐνες Gal4Sc1-345, Gal4Sc321-345 και Gal4Sc1-320.

5.9 Εξέταση μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης E(spl)m7. Ρόλος της Orange περιοχής και εξάρτηση της κατασταλτικής λειτουργίας από την πρωτεΐνη Groucho.

Στο παραπάνω σύστημα εξετάστηκαν η επίδραση μεταλλαγμένων μορφών της E(spl)m7 στην ενεργοποίηση της μεταγραφής από την πρωτεΐνη Sc και συγκρίθηκαν με αυτή του αγρίου τύπου μορίου, ώστε να εκτιμηθεί ο ρόλος των διαφόρων περιοχών της πρωτεΐνης.

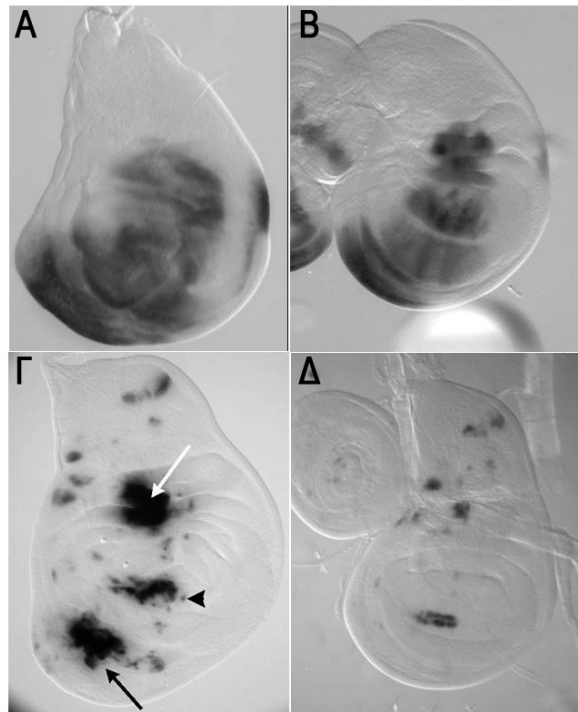
Αρχικά, μεταλλάχθηκαν αμινοξέα που βρίσκονται στην περιοχή Orange, συντηρημένα μεταξύ των πρωτεϊνών E(spl)m7 και E(spl)m8, των δύο πρωτεϊνών που εκφράζονται περισσότερο από όλες τις άλλες στα κύτταρα του προνευρικού συναθροισμού (**Εικόνα 21 Α**). Τα αμινοξέα αυτά είναι στην πρώτη περίπτωση το αμινοξύ S95>A, στη δεύτερη περίπτωση τα T114>N και H115>Q και στην τρίτη περίπτωση τα N92>T και E93>K. Σε όλες τις περιπτώσεις οι παραπάνω μεταλλαγές δεν είχαν καμία επίδραση στην κατασταλτική λειτουργία της E(spl)m7 πρωτεΐνης. Αντίθετα, όταν όλη η περιοχή Orange αφαιρέθηκε από το μόριο, η κατασταλτική ιδιότητα της πρωτεΐνης E(spl)m7 μειώθηκε σε ιδιαίτερα σημαντικό βαθμό. Το μόριο αυτό ποτέ δεν ανιχνεύθηκε ανοσολογικά σε πειράματα ανάλυσης Western από εκχυλίσματα διαμολυσμένων S2 κυττάρων, καθιστώντας το αποτέλεσμα της δραματικής μείωσης της δραστηριότητας της μεταλλαγμένης E(spl)m7 πρωτεΐνης ανίσχυρο.

Μία άλλη μεταλλαγμένη μορφή της E(spl)m7 πρωτεΐνης που εξετάστηκε είναι αυτή στην οποία έχει απομακρυνθεί το τελικό καρβοξυτελικό αμινοξύ της (**Εικόνα 21 Β**). Με αυτόν τον τρόπο, η E(spl)m7 δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με το συγκαταστολέα Groucho και κατ' επέκταση να καταστείλει τη διαδικασία της νευρογένεσης (Paroush et al 1994) ή την έκφραση ενός γονιδίου αναφοράς, ενεργοποιημένο από την πρωτεΐνη Sc, όπως έχει ήδη περιγραφεί παραπάνω. Πράγματι, όπως αναμενόταν, η κατασταλτική λειτουργία της E(spl)m7 πρωτεΐνης εκμηδενίζεται υπό αυτές τις προϋποθέσεις, όταν καλείται να ανταγωνιστεί τη λειτουργία του χιμαιρικού μορίου GAL4Sc₁₋₃₄₅ σε S2 κύτταρα. Είναι όμως αξιοπρόσεκτο το γεγονός ότι όταν στο ίδιο σύστημα συνεκφράζονται η E(spl)m7ΔW και η GAL4Sc₃₂₁₋₃₄₅, εξακολουθεί να παρατηρείται καταστολή του γονιδίου αναφοράς, αν και αυτή είναι αρκετά μικρότερη σε έκταση σε σύγκριση με την αγρίου τύπου E(spl)m7 πρωτεΐνη.



Εικόνα 21: **A)** Επίδραση σημειακών μεταλλαγών στην περιοχή Orange ή της έλλειψης όλης της περιοχής της πρωτεΐνης E(spl)m7 στην κατασταλτική της λειτουργία. **B)** Σύγκριση της κατασταλτικής λειτουργίας της wt (αγρίου τύπου) E(spl)m7 και της E(spl)m7ΔW (ΔW), η οποία δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με Groucho. **Γ)** Η πρωτεϊνική αλληλουχία της πρωτεΐνης E(spl)m7, όπου απεικονίζονται με κόκκινο τα αμινοξικά κατάλοιπα που μεταλλάχθηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας. Με τονισμένα γράμματα φαίνεται η περιοχή που απαλείφθηκε στην πρωτεΐνη E(spl)m7Δorange. Η περιοχή Orange αρχίζει από Q₈₀ και τελειώνει στη Q₁₂₅.

Για τη αναλυτικότερη διερεύνηση του ρόλου των επιμέρους περιοχών της πρωτεΐνης E(spl)m7 δημιουργήθηκαν κατάλληλα διαγονιδιακά στελέχη *Drosophila* για την υπερέκφραση πρωτεϊνών, οι οποίες αποτελούνται είτε μόνο από το αμινοτελικό τμήμα της E(spl)m7, μέχρι το τέλος της bHLH περιοχής είτε από το καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης, αρχίζοντας από την Orange περιοχή, συντηγμένα το καθένα με την ενεργοποιητική περιοχή VP16 [E(spl)m7bHLHVP16 και E(spl)m7OrangeVP16 αντίστοιχα]. Η δράση των διαγονιδίων εκτιμήθηκε με τα γονίδια αναταποκριτές *GbeB1-lacZ* και *EE4-lacZ*. Η υπερέκφραση της E(spl)m7OrangeVP16 δεν ενεργοποιεί κανένα από τα παραπάνω καθώς δεν μπορεί να προσδεθεί στο DNA ή να αλληλεπιδράσει με τις ενδογενείς προνευρικές πρωτεΐνες (μη επιδεικνυόμενα αποτελέσματα). Ωστόσο, στην **Εικ. 22** φαίνεται ότι ούτε η E(spl)m7bHLHVP16 δεν μπορεί να ενεργοποιήσει τον *EE4* ενισχυτή όπως η αγρίου τύπου E(spl)m7VP16, αν και – σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα – συνίσταται από το τμήμα της πρωτεΐνης που αλληλεπιδρά με τις προνευρικές πρωτεΐνες και ταυτόχρονα παρουσιάζει δραστικότητα πρόσδεσης στο DNA, αφού είναι ικανή να ενεργοποιήσει το *GbeB1-lacZ*. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει τη σημασία της Orange περιοχής υποστηρίζοντας τα αποτελέσματα των πειραμάτων παροδικής διαμόλυνσης και συνεπάγεται ότι η περιοχή Orange είναι απαραίτητη για τη δράση της E(spl)m7VP16, και κατ' επέκταση της E(spl)m7, in vivo.



Εικόνα 22: Η περιοχή Orange είναι απαραίτητη για τη δράση της E(spl)m7 in vivo. **A-B)** Τόσο η E(spl)m7VP16 (A) όσο και E(spl)m7bHLHVP16 (B) είναι ικανές για την ενεργοποίηση του *GbeB1-lacZ*. **Γ-Δ)** Μόνο η E(spl)m7VP16 (Γ) και όχι η E(spl)m7bHLHVP16 (Δ) μπορεί να ενεργοποιήσει τον *EE4-lacZ*.

5.10 Πιθανός ρόλος της περιοχής ενεργοποίησης της μεταγραφής της πρωτεΐνης Sc στην καταστολή από *E(spl)m7* in vivo.

Το ερώτημα που αναπόφευκτα τίθεται μετά από την ταυτοποίηση των περιοχών αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών Sc και *E(spl)m7* και την επιβεβαίωση του ρόλου της στη μεταγραφή είναι αν τελικά αυτή παίζει κάποιο ρόλο in vivo. Όμως, πριν απαντηθεί αυτό το ερώτημα, πρέπει να ληφθεί υπ' όψη το γεγονός ότι η πρωτεΐνη Sc δε δρα μόνη της, αλλά ετεροδιμερίζεται με την πρωτεΐνη Da in vivo, η οποία θα μπορούσε να παρέχει μία δεύτερη περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (Quong et al., 1993), όπως άλλωστε και μία εναλλακτική επιφάνεια πρόσδεσης – αλληλεπίδρασης με *E(spl)* πρωτεΐνες (Alifragis et al., 1997). Η πειραματική προσέγγιση βασίστηκε στην υπερέκφραση διαγονιδίων και την ανάλυση απόκρισης γονιδίων αναφοράς in vivo.

Αρχικά, κατασκευάστηκαν δύο διαγονίδια *UAS-Sc*, τα οποία κωδικούσαν τις πρωτεΐνες *Sc*₁₋₂₆₀ και *Sc*₁₋₂₉₀, τα οποία στερούνταν της καρβοξυτελικής ενεργοποιητικής αλληλουχίας της πλήρους έκτασης πρωτεΐνης *Sc*₁₋₃₄₅, είναι όμως ικανές να ετεροδιμερίζονται με την πρωτεΐνη Da βάσει των αποτελεσμάτων του Πίν. 3. Στη συνέχεια αναλύθηκε η επίδραση της υπερέκφρασης τους σε σύγκριση με την επίδραση της υπερέκφρασης αγρίου τύπου πρωτεΐνης Scute στην ενεργοποίηση των *EE4-lacZ* και *ac-lacZ* γονιδίων αναφοράς, απουσία ή παρουσία διαφόρων μορφών *E(spl)m7* διαγονιδίων.

Στην **Εικ. 23 Α – Δ** φαίνεται ότι τα διαγονίδια *Sc*₁₋₂₆₀ *Sc*₁₋₂₉₀ ενεργοποίησαν σε μικρότερο βαθμό το *EE4-lacZ* απ'ότι η *Sc*₁₋₃₄₅, όταν υπερεκφράστηκαν στην περιοχή έκφρασης του γονιδίου *pnr*, (περικλειόμενη από τα παραλληλόγραμμα στην **Εικ. 23 Β**), πιθανότατα λόγω της έλλειψης της ενεργοποιητικής περιοχής της Sc. Πιθανότατα, η μικρή ενεργοποίηση που παρατηρείται οφείλεται στην περιοχή ενεργοποίησης της Da, που ετεροδιμερισμένη με τις πρωτεΐνες Sc, προσδένεται στις ρυθμιστικές ακολουθίες του γονιδίου αναφοράς.

Η ικανότητα των βραχέων Sc πρωτεϊνών να αλληλεπιδράσουν και να στρατολογήσουν την *E(spl)m7* στον *EE4* ενισχυτή εξετάστηκε με την επίδραση της συνυπερέκφρασης της πρωτεΐνης *Sc*(1-260) και της *E(spl)m7KNEQVP16* στην περιοχή *pnr* (**Εικ. 23 Ε – Ζ**). Υπενθυμίζεται ότι *E(spl)m7KNEQVP16* δεν μπορεί να προσδεθεί σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες παρά μόνο μέσω αλληλεπιδράσεων με προνευρικές πρωτεΐνες. Όπως αναμενόταν, η *E(spl)m7KNEQVP16* υπερεκφραζόμενη από μόνη της εντείνει την έκφραση του *EE4-lacZ* μόνο στους προνευρικούς συναθροισμούς, όπου η πρωτεΐνη Sc εκφράζεται ενδογενώς (**Εικ. 23 Ε**, κεφαλές βελών). Η συνυπερέκφρασή της δε με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη Sc, ενεργοποιεί έντονα και καθολικά το *EE4-lacZ*, σε αντίθεση με την ελαφριά

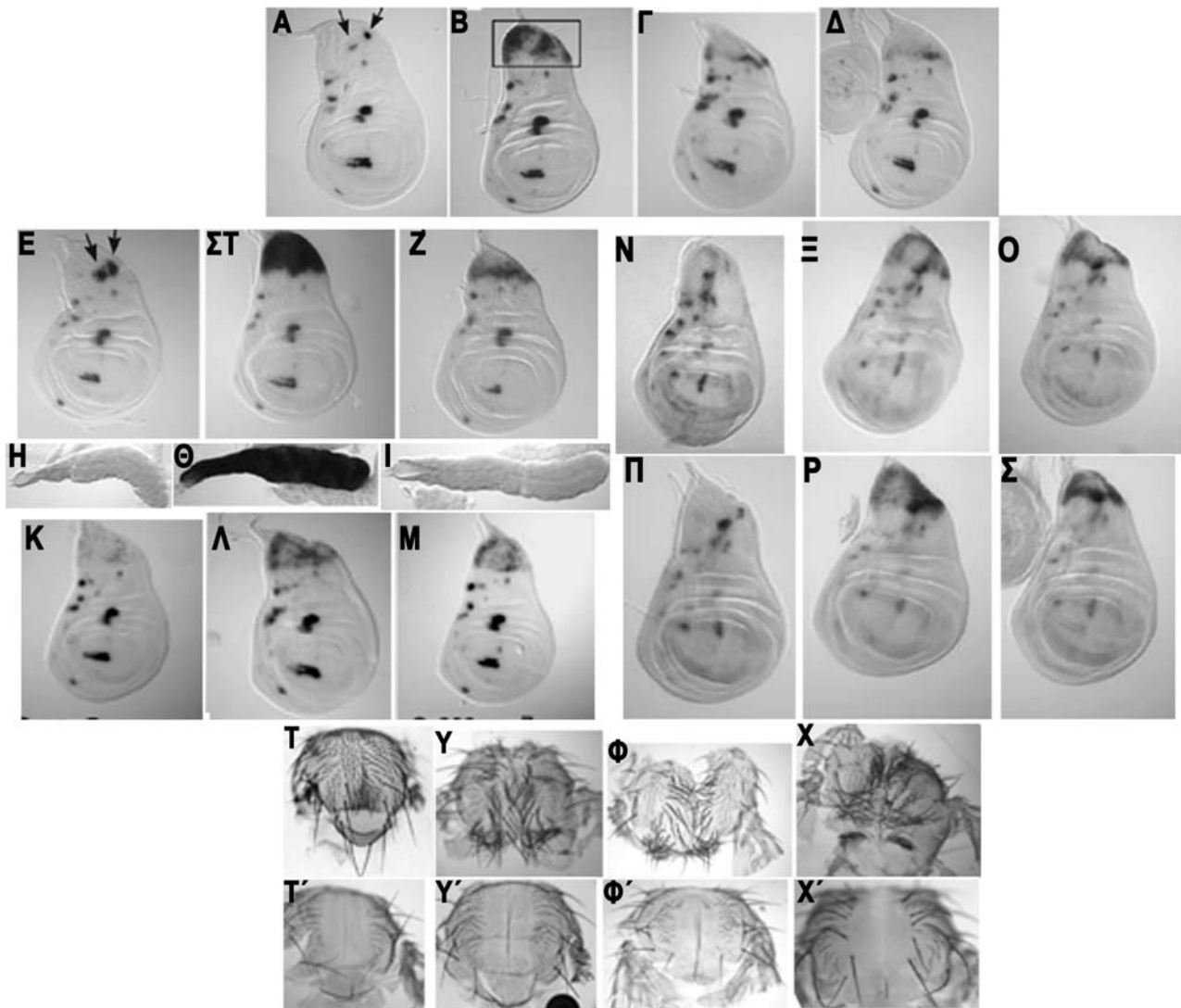
μορφή ενεργοποίησης που συνεπάγεται η συνυπερέκφρασή της με την πρωτεΐνη Sc₁₋₂₆₀ (**Εικ. 23 ΣΤ - Ζ**). Οι διαφορές γίνονται ακόμα πιο εμφανείς, όταν η έκφραση του *EE4-lacZ* εξετάστηκε σε διαφορετικό ιστό, τους προνυμφικούς σιελογόνους αδένες, υπό συνθήκες υπερέκφρασης του ίδιου συνδυασμού διαγονιδίων (**Εικ. 23 Η - Ι'**). Επομένως, η E(spl)m7KNEQVP16 δεν μπορεί να προσελκυθεί και να προσδεθεί αποτελεσματικά στον *EE4* ενισχυτή από τη Sc₁₋₂₆₀, πιθανότατα λόγω της έλλειψης της περιοχής αλληλεπίδρασης της Sc. Στους αναπτυξιακούς δίσκους τουλάχιστον η ύπαρξη της Da είναι ικανή ωστόσο να αλληλεπιδράσει σε μικρό βαθμό με την E(spl)m7KNEQVP16.

Το παραπάνω φαινόμενο εξετάστηκε επιπλέον με το ακόλουθο, «αντίστροφο» πείραμα, στο οποίο αντί της E(spl)m7KNEQVP16, χρησιμοποιήθηκε η αγρίου τύπου E(spl)m7. Αν και η ενεργοποίηση του *EE4-lacZ* από τις Sc₁₋₂₆₀ και Sc₁₋₂₉₀ ήταν μικρή, παρέμεινε ουσιαστικά μη καταστάσιμη από την E(spl)m7, εν αντιθέσει με την έντονη καταστολή του *EE4-lacZ* σε συνθήκες συνυπερέκφρασης E(spl)m7 και Sc (**Εικ. 23 Κ - Μ**).

Τα ίδια πειράματα διεξήχθησαν αναλύοντας την έκφραση ενός διαφορετικού γονιδίου αναφοράς, του *ac-lacZ*, το οποίο κατευθύνεται από τη δράση του 5' εγγύς ενισχυτή του γονιδίου *ac*. Ο συγκεκριμένος φυσικός ενισχυτής είναι πιο σύνθετος από τον *EE4*, καθώς περιέχει θέσεις πρόσδεσης για περισσότερους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα ετεροδιμερή Da/Sc, E(spl) και Sens (Martinez et al., 1993, Jafar-Nejad et al., 2003) και εκφράζεται στο πρότυπο των προνευρικών συναθροισμών. Ανόμοια με το *EE4-lacZ*, το γονίδιο *ac-lacZ* ενεργοποιήθηκε σημαντικά τόσο από Sc₁₋₃₄₅ και Sc₁₋₂₆₀ (**Εικ. 23 Ν - Ο**), όσο και όταν συνυπερεκφράστηκαν με E(spl)m7KNEQVP16 (**Εικ. 23 Π - Σ**). Με άλλα λόγια, η περιοχή ενεργοποίησης της Sc είναι μη απαραίτητη στην ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς *ac-lacZ*, καθώς και στην στρατολόγηση της E(spl)m7 στον ενισχυτή. Άρα η αναγκαιότητα του καρβοξυτελικούτελικού τμήματος της Scute τόσο για την ενεργοποίηση όσο και για τη στρατολόγηση της E(spl)m7 εξαρτάται από τον ενισχυτή υπό μελέτη.

Το πρότυπο δημιουργίας εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων στο θώρακα ενήλικων ατόμων υπό συνθήκες υπερέκφρασης των Sc₁₋₂₆₀ και Sc₁₋₂₉₀ είναι το ίδιο ενεργές συγκριτικά με την πλήρους έκτασης Sc. Επιπλέον, η συνυπερέκφραση της E(spl)m7 οδήγησε ανταγωνίζεται στο ίδιο βαθμό την ενεργότητα των διάφορων Scute πρωτεϊνών. Υπενθυμίζεται ότι το πρότυπο των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων είναι αποτέλεσμα συντονισμένης δράσης γονιδίων, των οποίων οι ενισχυτές είναι στόχοι τόσο των προνευρικών όσο και των E(spl). Φαίνεται ότι στα επίπεδα υπερέκφρασης που επιτυγχάνονται με *pnr-GAL4*, η προσέλκυση μέσω των υπερεκφραζόμενων προνευρικών πρωτεϊνών (παρόντων σε σύμπλοκα με την πρωτεΐνη Da) άλλων παραγόντων-συμπεριλαμβανομένου και των E(spl)- στους

ενισχυτές στόχους καθιστά την τελική καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης Scute μη απαραίτητη για την μεταγραφική ρύθμιση (Εικόνα 23 Τ-Χ, Τ'-Χ').

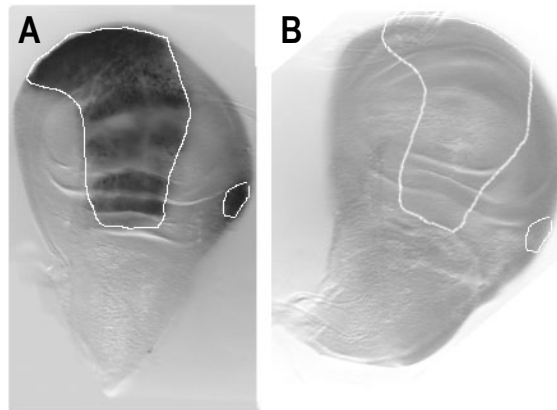


Εικόνα 23: Η καρβοξυτελική περιοχή της Scute δεν είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση ή τη στρατολόγηση της E(spl)m7KNEQVP16 ή της E(spl)m7 στα πλαίσια του σύνθετου φυσικού ενισχυτή ή της διαδικασίας ανάπτυξης των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων στο θώρακα ενήλικων ατόμων *Drosophila*. **A)** Αγρίου τύπου πρότυπο έκφρασης του EE4-lacZ **B-Z)** Επίδραση της υπερέκφρασης Sc₁₋₃₄₅ (B), Sc₁₋₂₉₀ (Γ), Sc₁₋₂₆₀ (Δ), E(spl)m7KNEQVP16 (E, Η'), Sc₁₋₃₄₅ και E(spl)m7KNEQVP16 (ΣΤ, θ), Sc₁₋₂₆₀ και E(spl)m7KNEQVP16 (Z, Ι) Sc₁₋₃₄₅ και E(spl)m7 (K), Sc₁₋₂₉₀ και E(spl)m7 (Λ) και Sc₁₋₂₆₀ και E(spl)m7 (M) στο πρότυπο έκφρασης του EE4-lacZ. Η καρβοξυτελική περιοχή της Scute είναι υπεύθυνη για την εντονότερη ενεργοποίηση ή τη στρατολόγηση της E(spl)m7KNEQVP16 ή της E(spl)m7. **N)** Αγρίου τύπου πρότυπο έκφρασης του ac-lacZ **Ξ-Θ)** Επίδραση της υπερέκφρασης Sc₁₋₃₄₅ και E(spl)m7KNEQVP16 (Ξ), Sc₁₋₂₆₀ και E(spl)m7KNEQVP16 (O) στο ac-lacZ. **T)** Αγρίου τύπου πρότυπο κατανομής των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων στο θώρακα **Υ-Χ)** Επίδραση της υπερέκφρασης Sc₁₋₃₄₅ (Υ), Sc₁₋₂₉₀ (Φ), Sc₁₋₂₆₀ (Χ), **Τ'-Χ')** Υπερέκφραση της E(spl)m7 σε γενετικό υπόστρωμα των T-X αντιστοιχώς.

6 Αποτελέσματα (Μέρος Β)

6.1 Εξέταση του προτύπου έκφρασης του Hey.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του ιστοειδικού προτύπου έκφρασης του γονιδίου Hey σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια της *Drosophila melanogaster*, καθώς μία τέτοια ανάλυση τείνει να δώσει αρκετά σημαντικές ενδείξεις για τη λειτουργία και τη ρύθμιση ενός γονιδίου. Η ανάλυση βασίστηκε τόσο σε πειράματα *in situ* υβριδισμού με RNA ανιχνευτή, τα οποία σε μεγάλο βαθμό πραγματοποιήθηκαν σε άλλο εργαστήριο (Dr. Annette Preiss, Hohenheim, Stuttgart), αλλά παρατίθενται για την πληρέστερη εικόνα του προτύπου έκφρασης του γονιδίου, όσο και σε ιστοχημικές χρώσεις με ορό από ανοσοποιημένα για την πρωτεΐνη Hey ποντίκια. Ο ορός των ανοσοποιημένων ποντικών δοκιμάστηκε πρώτα για την ειδικότητα του σε αναπτυξιακούς δίσκους φτερού, όπου πραγματοποιήθηκε η υπερέκφραση είτε του γονιδίου Hey είτε του γονιδίου *deadpan* (Εικ. 24 Α, Β). Αν και τα δύο αυτά γονίδια ανήκουν στην ίδια οικογένεια των hairy/E(spl) πρωτεϊνών, ο ορός είναι ειδικός για την πρωτεΐνη Hey.



Εικόνα 24: Η ειδικότητα του αντισώματος εξετάστηκε σε αναπτυξιακούς δίσκους φτερού προνύμφης 3ου σταδίου, οι οποίοι υπερεκφράζουν είτε *Hey* (Α) είτε *deadpan* (Β) στην περιοχή έκφρασης του γονιδίου *omb*, όπως αυτή περικλείεται από τη λευκή καμπύλη γραμμή.

6.2 Εμβρυικό πρότυπο έκφρασης του γονιδίου Hey.

Τα πρώτα δείγματα στα οποία εξετάστηκε το πρότυπο έκφρασης του Hey ήταν έμβρυα σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια (Εικ. 25). Είναι σαφές ότι το πολυκλωνικό αντίσωμα ανιχνεύει το ίδιο πρότυπο έκφρασης με τα πειράματα του *in situ* υβριδισμού (Εικ. 25 Κ-Λ). Πειράματα *in situ* υβριδισμού (Εικ. 25 Α-Δ) αλλά και ανοσοιστοχημικών χρώσεων (Εικ. 25 Ε-Ι) αποκάλυψαν ότι το Hey αρχικά εκφράζεται σε κύτταρα του ΚΝΣ. Αργότερα κατά την εμβρυική ανάπτυξη, η έκφρασή του ανιχνεύεται επιπρόσθετα σε κύτταρα του ΠΝΣ (Εικ. 25 Θ,

λευκά βέλη). Η έκφραση του *Hey* παρατηρείται για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια του σταδίου 11 (**Εικ. 25 E**) (ταξινόμηση εμβρυικών σταδίων σύμφωνα με Hartenstein και Campos-Ortega) σε μία σειρά κυττάρων με χαρακτηριστικό επαναλαμβανόμενο σχήμα σχήμα. Καθώς η πολυπλοκότητα του αναπτυσσόμενου ΚΝΣ αυξάνει με τη γένεση των νευροβλαστών και την πρόσθεση νέων νευρώνων, αυξάνει και η πολυπλοκότητα του προτύπου έκφρασης του *Hey*.

Για να διευκρινιστεί ο τύπος των κυττάρων στα οποία παρατηρείται η έκφραση του *Hey*, πραγματοποιήθηκαν διπλές και τριπλές ανοσοιστοχημικές χρώσεις έναντι *Hey* και άλλων αντιγόνων, των οποίων η έκφραση αποτελεί χαρακτηριστικό συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων στο νευρικό σύστημα της *Drosophila*.

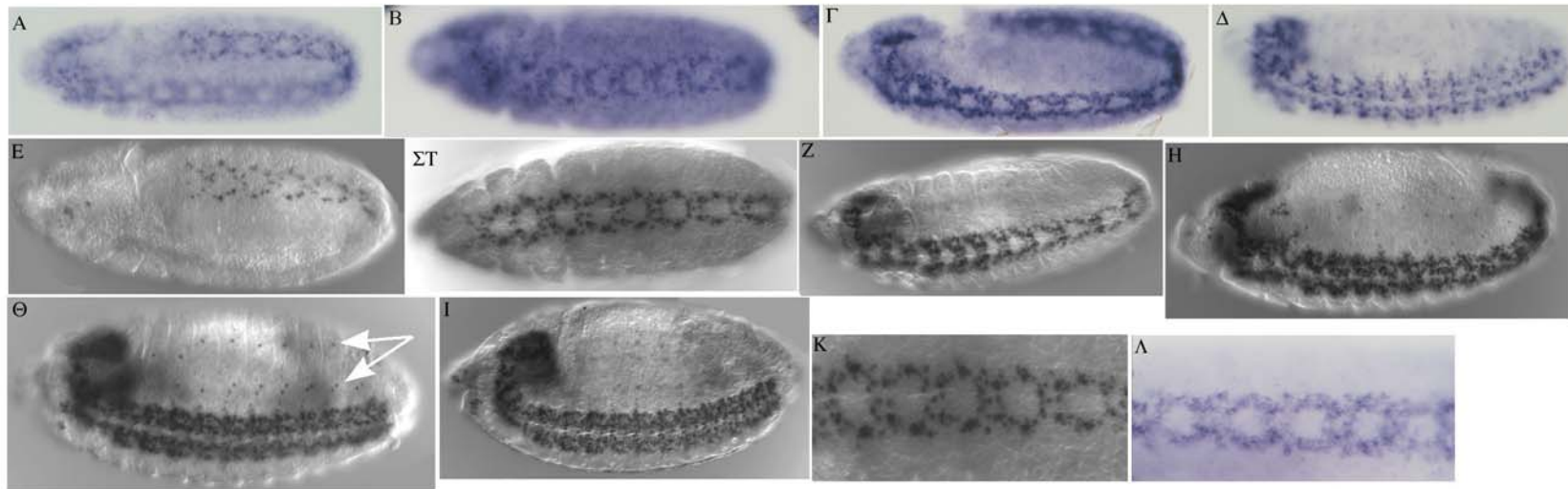
Για να επιβεβαιωθεί ότι το γονίδιο *Hey* εκφράζεται σε κύτταρα του νευρικού συστήματος, διεξήχθη διπλή ανοσοιστοχημική χρώση για την ανίχνευση *Hey* και *LacZ* σε διάφορων αναπτυξιακών σταδίων έμβρυα ενός διαγονιδιακού στελέχους *Drosophila*, στο οποίο το γονίδιο της *lacZ* εκφράζεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *scratch*. Το γονίδιο *scratch* έχει χαρακτηριστεί ως παν-νευρικό, γιατί εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα του νευρικού συστήματος ξεκινώντας από τους νευροβλάστες (Emery and Bier 1995). Στην **Εικ. 26** φαίνεται ότι στα κύτταρα που εκφράζουν *Hey* ο υποκινητής του *scratch* είναι ενεργός, αφού ανιχνεύεται και *lacZ*. Συνεπώς, τα κύτταρα αυτά αποτελούν συστατικά στοιχεία του ΚΝΣ. Είναι χαρακτηριστικό το γεγονός ότι οι νευροβλάστες παραμένουν προς την επιφάνεια του εμβρύου ενώ τα παράγωγα των μιτωτικών τους διαιρέσεων, τα γαγγλιακά μητρικά κύτταρα και οι νευρώνες ή/και τα κύτταρα γλοίας, ωθούνται προς το εσωτερικό του εμβρύου. Με αυτόν τον τρόπο οι παλιότεροι νευρώνες είναι πιο εσωτερικά τοποθετημένοι σε σχέση με τους καινούριους. Τα εσωτερικά τοποθετημένα, θετικά για την παρουσία της *Hey* πρωτεΐνης κύτταρα φαίνεται να μην είναι λοιπόν νευροβλάστες, οι οποίοι διακρίνονται από το μεγάλο τους μέγεθος και την επιφανειακή τους θέση, αλλά παράγωγα αυτών, δηλαδή γαγγλιακά μητρικά κύτταρα, νευρώνες ή γλοία.

Το γεγονός ότι η έκφραση του *Hey* παρατηρείται για πρώτη φορά στο στάδιο 11 (**Εικ. 25 E**) αποτελεί επιπλέον ένδειξη ότι το γονίδιο *Hey* δεν εκφράζεται σε νευροβλάστες. Οι πρώτοι νευροβλάστες αρχίζουν να εμφανίζονται κατά το τέλος του σταδίου 8 ως μεγεθυμένα (σε σχέση με τα γειτονικά τους) εκτοδερμικά κύτταρα και αποχωρίζονται από το νευροεκτόδερμα στην αρχή του σταδίου 9. Για την επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης πραγματοποιήθηκε διπλή χρώση εμβρύων διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων με ορό α-*Hey* και πολυκλωνικό αντίσωμα α-*Asense* (α-*Ase*). Το γονίδιο *asense* εκφράζεται στους νευροβλάστες και στα γαγγλιακά μητρικά κύτταρα του εμβρύου (Gonzalez et al 1989, Brand et al 1993, Jarman et al 1993). Τα αποτελέσματα αυτών των χρώσεων φαίνονται στην **Εικ. 27 A - Θ**. Σε

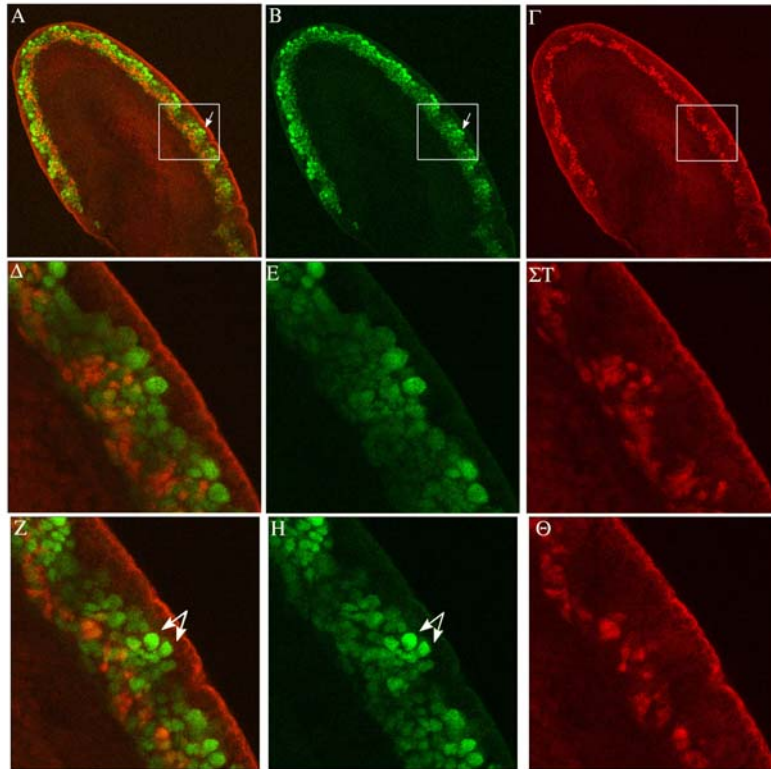
όλα τα αναπτυξιακά στάδια που εξετάστηκαν, δεν υπήρχε ποτέ συνεντοπισμός της πρωτεΐνης Hey και Asense, αποδεικνύοντας ότι τα κύτταρα όπου εκφράζεται το γονίδιο Hey δεν είναι νευροβλάστες αλλά μάλλον τα παράγωγα αυτών, δηλαδή γαγγλιακά μητρικά κύτταρα ή νευρώνες. Στην **Εικόνα 27 Z-Θ** παρατίθενται μονές τομές συνεστιακού μικροσκοπίου, από το εξωτερικό προς το εσωτερικό αντίστοιχα. Σε αυτές διασαφηνίζεται ότι τα κύτταρα που εκφράζουν Hey (χρωματισμένα πράσινα) βρίσκονται εσωτερικά των *asense* κυττάρων (χρωματισμένα κόκκινα).

Για την περαιτέρω εξακρίβωση της ταυτότητας των Hey εκφραζόντων κυττάρων, διεξάχθηκε διπλή ιστοχημική χρώση για τις πρωτεΐνες Hey και Elav. Η πρωτεΐνη Elav είναι πυρηνική πρωτεΐνη που προσδένεται σε RNA, μάλλον κατέχει ρόλο στη συρραφή εξωνίων και έχει δειχθεί ότι είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση και τη διατήρηση τού νευρικού συστήματος. Πιο σημαντικό ακόμα είναι το γεγονός ότι εκφράζεται σε όλους τους μεταμιτωτικούς νευρώνες αμέσως μετά τη γέννησή τους. Δεν εκφράζεται καθόλου σε νευροβλάστες, γαγγλιακά μητρικά κύτταρα ή γλοία (Yao et al 1993). Η **Εικ. 28** απεικονίζει ένα τέτοιο πείραμα. Είναι φανερό ότι σε ένα υποσύνολο θετικών για Elav πρωτεΐνη κυττάρων, τα οποία δεν μπορεί να είναι παρά μεταμιτωτικοί νευρώνες, ανιχνεύεται έκφραση της πρωτεΐνης Hey. Επομένως, το γονίδιο *Hey* εκφράζεται σε ένα υποσύνολο νευρώνων, των οποίων όμως η ταυτότητα δεν διευκρίνιστηκε περαιτέρω.

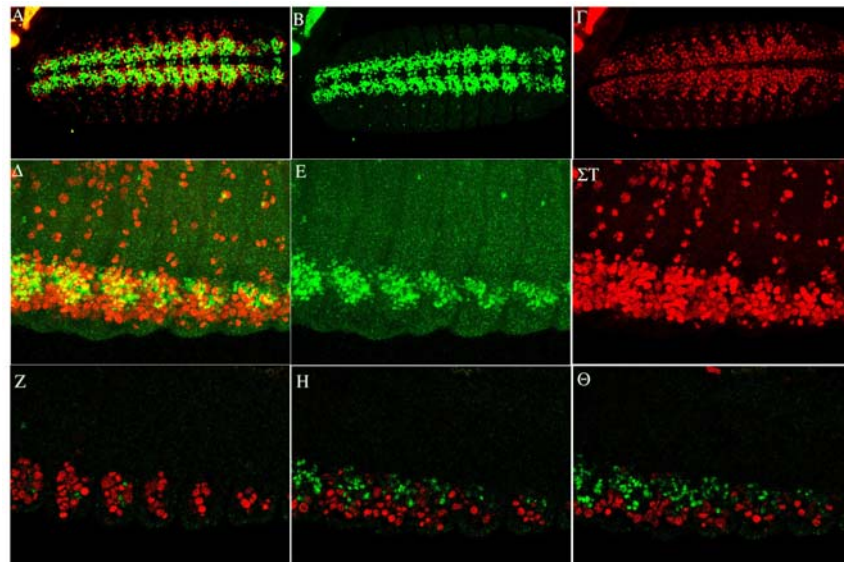
Τέλος, έγινε προσπάθεια να απαντηθεί το ερώτημα εάν η πρωτεΐνη Hey εντοπίζεται σε κύτταρα γλοίας. Γι' αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκε διπλή ανοσοιστοχημική χρώση σε έμβρυα για τις πρωτεΐνες Hey και Repo. Η πρωτεΐνη Repo είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων γλοίας (Xiong et al 1994, Halter et al 1995). Ποτέ δεν παρατηρήθηκε συνεντοπισμός των δύο εξεταζόμενων πρωτεϊνών στο ίδιο κύτταρο, επιβεβαιώνοντας το προαναφερόμενο συμπέρασμα, ότι δηλαδή το γονίδιο Hey εκφράζεται σε ένα υποσύνολο νευρώνων (**Εικ. 29**).



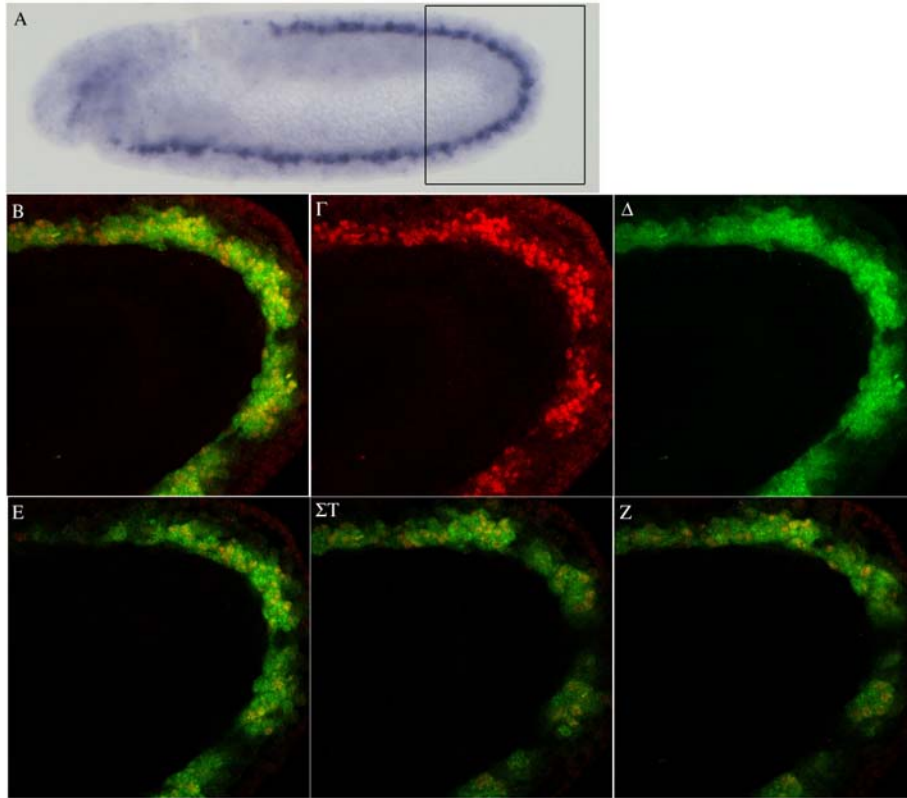
Εικόνα 25: **A-Δ)** Πρότυπο έκφρασης του Hey mRNA σε έμβρυα *Drosophila* διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων. **E-I)** Πρότυπο έκφρασης του γονιδίου Hey μετά από ανοσοιστοχημική χρώση εμβρύων *Drosophila* διαφόρων αναπτυξιακών σταδίων. Τα λευκά βέλη στην εικόνα 2Θ υποδεικνύουν τα κύτταρα του ΠΝΣ όπου ανιχνεύεται η πρωτεΐνη Hey. **K-Λ)** Μεγέθυνση τμήματος του ΚΝΣ μετά από ανοσοιστοχημική χρώση (K) και in situ υβριδισμό (Λ) για Hey. Τα πρότυπα έκφρασης του γονιδίου είναι πανοιότυπα.



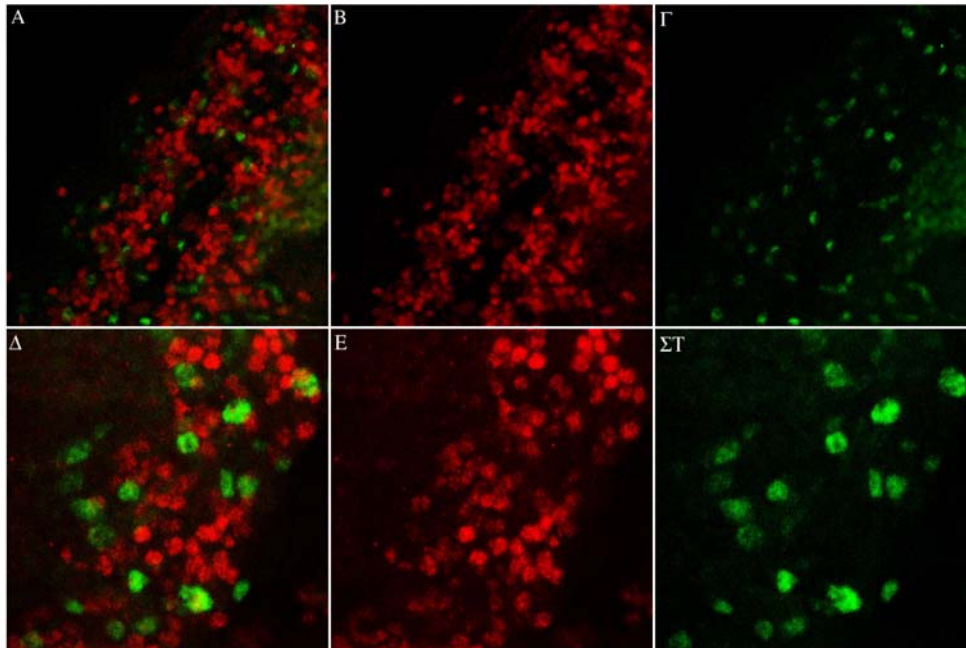
Εικόνα 26: Εγκάρσια όψη εμβρύων *scratch-lacZ* διαγενετικού στελέχους *Drosophila* μετά από διπλή ανοσοιστοχημική χρώση για *lacZ* (πράσινο Β, Ε, Η) και *Hey* (κόκκινο Γ, ΣΤ, Θ). Τα βέλη δείχνουν δύο από τους νευροβλάστες του εμβρύου. Η *Hey* πρωτεΐνη ανιχνεύεται στα πιο εσωτερικά *scratch* κύτταρα.



Εικόνα 27: Α-Γ) Κοιλιακή πλευρά εμβρύων όψιμου αναπτυξιακού σταδίου μετά από διπλή ανοσοιστοχημική χρώση για *Hey* (πράσινο) και *Asense* (κόκκινο) Δ-Ε) Μεγέθυνση πλευρικής όψης εμβρύου Ζ-Θ) Μονές τομές συνεστιακού μικροσκοπίου του ίδιου τμήματος που απεικονίζεται στο πλαίσιο Δ. Οι τομές απομακρύνονται από την επιφάνεια του εμβρύου προς το εσωτερικό του (Ζ>Η>Θ αντίστοιχα), αποδεικνύουν ότι δεν υπάρχει καμμία αλληλεπικάλυψη των *asense* και *Hey* κυττάρων.



Εικόνα 28: Ένα τμήμα του οπίσθιου τμήματος εμβρίου αντιστοιχεί με αυτό που επιδεικνύεται στο πλαίσιο A απεικονίζεται στα πλαίσια B, E-Z. Τα κύτταρα στα οποία ανιχνεύεται η πρωτεΐνη Hey είναι κόκκινα (Γ), ενώ οι νευρώνες, θετικοί για την πρωτεΐνη Elav, είναι πράσινοι (Δ). Στα πλαίσια E-Z απεικονίζονται μονές τομές συνεστιακού μικροσκοπίου για να επιβεβαιωθεί συνεντοπισμός της Hey και Elav σε υποσύνολο των νευρώνων.



Εικόνα 29: Τμήμα εμβρυϊκού ΚΝΣ χρωματισμένο για Hey (κόκκινο) και Repo (πράσινο) σε μικρότερη (Α-Γ) και μεγαλύτερη (Δ-ΣΤ) μεγέθυνση. Η πρωτεΐνη Hey ποτέ δεν εντοπίζεται σε κύτταρα γλοίας.

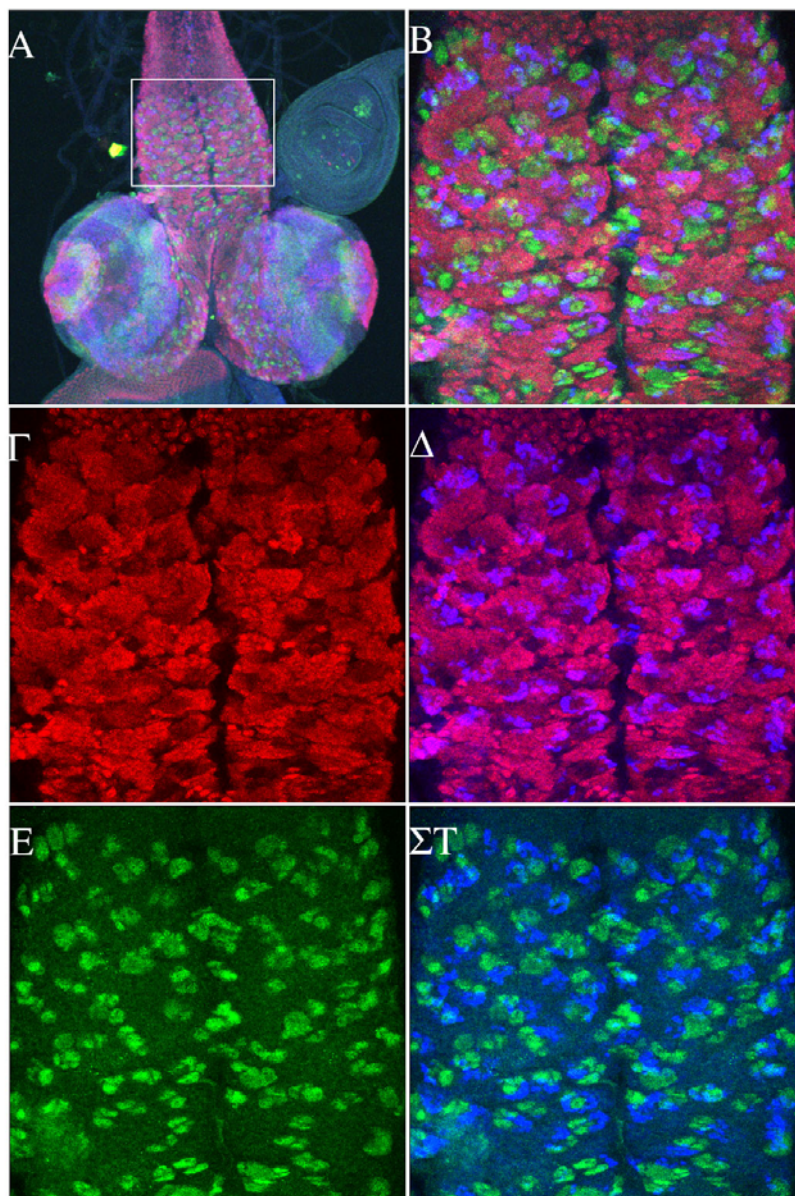
6.3 Πρότυπο έκφραση του γονιδίου *Hey* στην προνύμφη.

Ανοσοιστοχημικές χρώσεις πραγματοποιήθηκαν σε προνύμφες για την ανίχνευση του προτύπου έκφρασης του γονιδίου. Αρχικά, διεξάχθηκαν πειράματα χρώσεων σε αναπτυξιακούς δίσκους της προνύμφης. Εάν πράγματι η πρωτεΐνη *Hey* ήταν ένας πιθανός παράγοντας ετεροδιμερισμού με τις πρωτεΐνες *E(spl)*, όπως έχει υποθεθεί για τα θηλαστικά ομόλογα (βλ. εισαγωγή), αναμενόταν να υπάρχουν ανιχνεύσιμα επίπεδα *Hey* σε σημεία όπου εκφράζονταν και τα γονίδια του συμπλέγματος *E(spl)* και λάμβανε χώρα η διαδικασία της πλευρικής αναστολής. Ωστόσο, τέτοια έκφραση δεν παρατηρήθηκε τόσο με ανοσοιστοχημικά πειράματα όσο και με πειράματα *in situ* υβριδισμού. Πιθανότατα, το γονίδιο *Hey* δεν εκφράζεται καθόλου στους αναπτυξιακούς δίσκους της προνύμφης 3ου σταδίου, ή τα επίπεδα έκφρασης τού γονιδίου είναι ιδιαίτερα χαμηλά. Πρέπει να σημειωθεί ότι πειράματα ανίχνευσης πρωτεΐνης *Hey* πραγματοποιήθηκαν μόνο σε προνύμφες 3ου σταδίου.

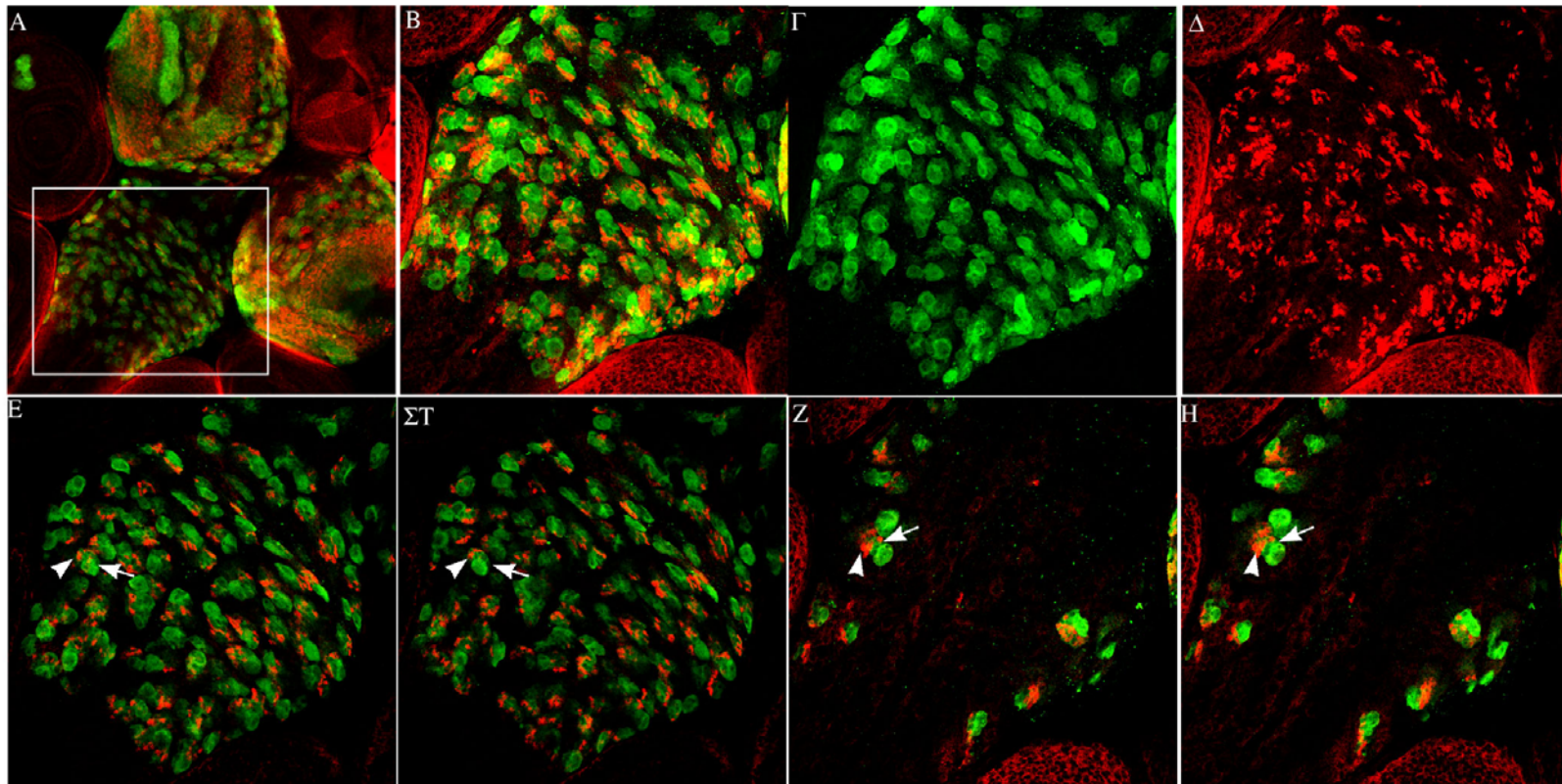
Έκφραση του γονιδίου ανιχνεύθηκε στο ΚΝΣ της προνύμφης με ανοσοιστοχημική χρώση. Στην **Εικ. 30** φαίνεται το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου *Hey* στο ΚΝΣ προνύμφης 3ου σταδίου, μετά από ανοσοιστοχημική χρώση για *Asense*, πρωτεΐνη-δείκτη των νευροβλαστών και γαγγλιακών μητρικών κυττάρων (Gonzalez et al 1989, Brand et al 1993), *Elav*, πρωτεΐνη-δείκτη των νευρώνων (Yao et al 1993) και *Hey*. Το γονίδιο *Hey* εκφράζεται έντονα σε κύτταρα των εγκεφαλικών ημισφαιρίων όσο και στο θωρακικό τμήμα της κοιλιακής χορδής. Στο κοιλιακό τμήμα της κοιλιακής χορδής δεν εκφράζεται καθόλου παρά μόνο σε κάποια κύτταρα της μέσης γραμμής.

Επικεντρώνοντας στο πρότυπο έκφρασης στο θωρακικό τμήμα της κοιλιακής χορδής προκύπτουν ενδιαφέροντα συμπεράσματα. Όπως και στην περίπτωση του εμβρυϊκού ΚΝΣ, έτσι και στο ΚΝΣ της προνύμφης, η πρωτεΐνη *Hey* συνεντοπίζεται με την *Elav* σε ένα υποσύνολο νευρώνων (**Εικ. 30 Γ, Δ**). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι σε αυτά τα κύτταρα, η πρωτεΐνη *Elav* δεν είναι αυστηρά πυρηνική αλλά η κατανομή της φαίνεται να είναι πιο διάχυτη και κυτταρολασματική. Αυτά τα κύτταρα είναι πιθανότατα νεογέννητοι νευρώνες. Αντίθετα, οι παλαιότεροι χρονολογικά νευρώνες παρουσιάζουν μία πιο αυστηρή πυρηνική κατανομή της πρωτεΐνης *Elav* (S. Bray, προσωπική επικοινωνία). Η υπόθεση αυτή στηρίζεται και στο γεγονός ότι οι περιέχοντες πρωτεΐνη *Hey* νευρώνες είναι πολύ κοντά τοπολογικά στους νευροβλάστες, η παρουσία των οποίων αποκαλύπτεται μετά από χρώση με α -*Asense* (**Εικ. 30 Ε, ΣΤ**). Είναι επομένως λογικό να υποθεθεί ότι η *Hey* πρωτεΐνη εκφράζεται παροδικά στους νεογέννητους νευρώνες και με την ωρίμανσή τους η έκφρασή της εκμηδενίζεται.

Παρόμοια συμπεράσματα προκύπτουν από ανοσοιστοχημικές χρώσεις εγκεφάλων προνυμφών 3ου σταδίου διαγονιδιακού στελέχους *Drosophila*, στο οποίο το γονίδιο *lacZ* εκφράζεται υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου *E(spl)my*. Στην περίπτωση αυτή (**Εικ. 31**) και επικεντρώνοντας στο θωρακικό τμήμα της κοιλιακής χορδής, *lacZ* συσσωρεύεται κυρίως στους ευδιάκριτους νευροβλάστες, αλλά ίσως λόγω της εξαιρετικής σταθερότητας που επιδεικνύει ως μόριο, ανιχνεύεται σε φθίνουσες ποσότητες στα απόγονα κύτταρα του νευροβλάστη, τα γαυλιακά μητρικά κύτταρα, τα οποία είναι λίγο μικρότερα κύτταρα σε στενή επαφή με το νευροβλάστη, και στα απόγονα, ακόμα μικρότερα, κύτταρα αυτών, δηλαδή τους νευρώνες. Είναι σαφές ότι η πρωτεΐνη Hey είναι συγκεντρωμένη στον πυρήνα κυττάρων που είναι μία σειρά κυττάρων μακρύτερα από τον σφαιρικό ευμεγέθη νευροβλάστη, στηρίζοντας έτσι την υπόθεση ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται σε νευρώνες, που λόγω της μικρή τους απόστασης από το νευροβλάστη, μπορεί να είναι νεογέννητοι νευρώνες.



Εικόνα 30: Το ΚΝΣ προνύμφης 3ου σταδίου επώαστηκε με αντισώματα έναντι Elav (κόκκινο), Asense (πράσινο), Hey (μπλέ) (Α). Το κοιλιακό μέρος του θωρακικού γαγγλίου φαίνεται στο πλαίσιο (Β). Στο πλαίσιο Δ φαίνεται ότι τα Hey κύτταρα είναι υποσύνολο των νευρώνων, χρωματισμένων για την παρουσία Elav (Γ). Οι νευρώνες αυτοί σχηματίζουν χαρακτηριστικές δομές γύρω από τους νευροβλάστες που είναι χρωματισμένοι για την παρουσία της πρωτεΐνης Asense (Ε-ΣΤ).

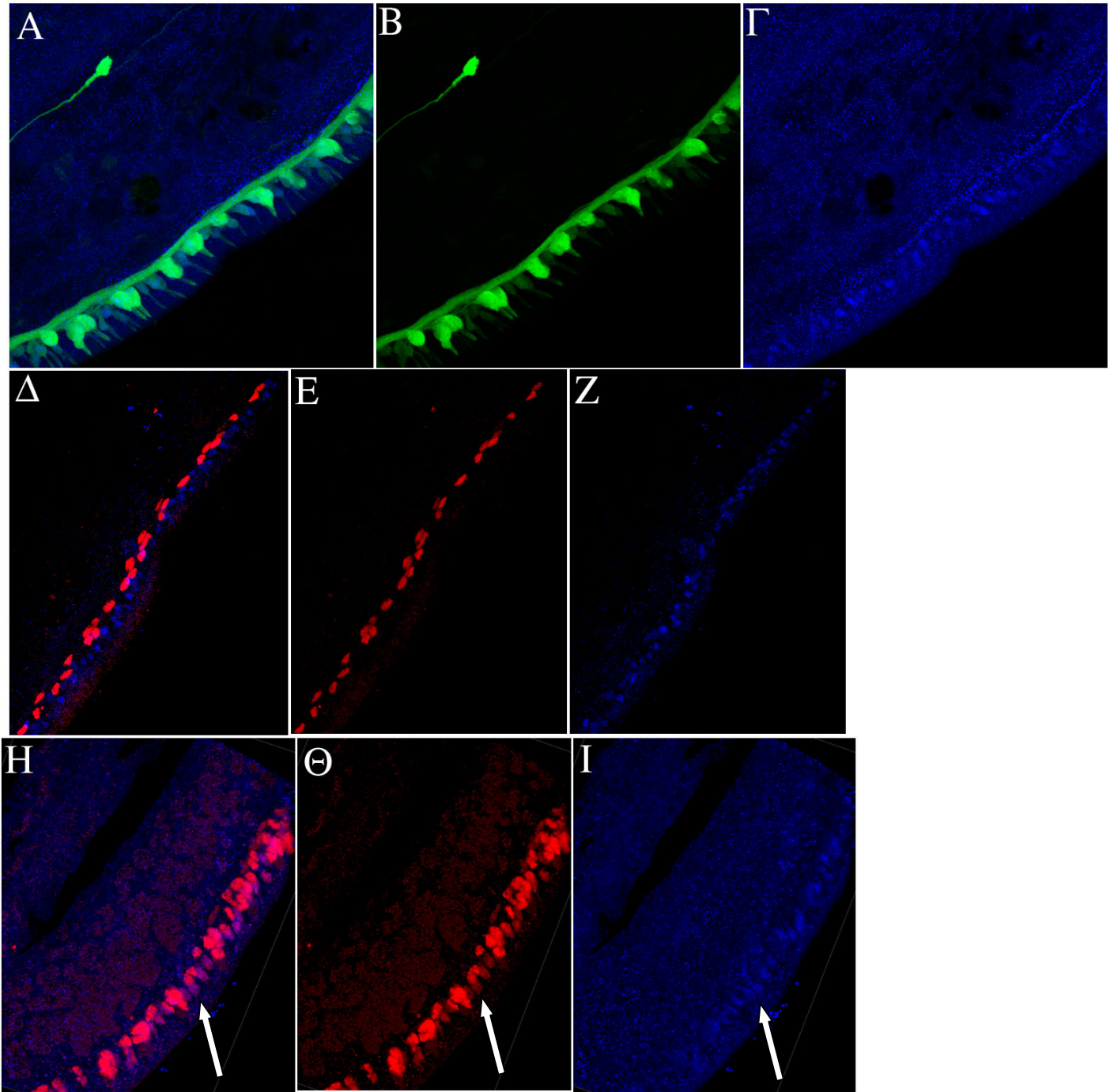


Εικόνα 31: Α) Το ΚΝΣ προνύμφης του *E(spl)my-lacZ* διαγενετικού στελέχους *Drosophila* χρωματισμένο για την παρουσία lacZ (πράσινο) και Hey (κόκκινο). Β) Μεγέθυνση του θωρακικού γαγγλίου, Γ,Δ) Διαχωρισμένα τα χρώματα του Β, Ε-Η) Μονές τομές συνεστιακού μικροσκοπίου από το ίδιο δείγμα. Τα βέλη δείχνουν τα πιθανά γαγγλιακά μητρικά κύτταρα, ευρισκόμενα δίπλα στο μεγάλο σφαιρικό νευροβλάστη, ενώ δίπλα τους και σε μεγαλύτερη απόσταση από τον νευροβλάστη βρίσκονται οι Hey νευρώνες, υποδεικνυόμενοι από τις κεφαλές των βελών.

6.4 Πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης στο στάδιο της νύμφης.

Ένας άλλος ιστός ο οποίος εξετάστηκε για έκφραση του Hey ο αναπτυξιακός δίσκος του φτερού 24 ώρες μετά την έναρξη του σταδίου της νύμφης. Στο στάδιο αυτό, έχει ολοκληρωθεί η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση των πρόδρομων αισθητηρίων κυττάρων του περιθωρίου του φτερού. Στην **Εικ. 32** φαίνεται ότι το γονίδιο *Hey* εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε νευρώνες, καθώς συνενετοπίζεται με την πρωτεΐνη GFP, της οποίας η έκφραση ελέγχεται από τον μεταγραφικό ενεργοποιητή GAL4 στο πρότυπο του *elav* υποκινητή. Δεν εντοπίζεται σε κύτταρα γλοίας που εκφράζουν *lacZ* υπό τον έλεγχο του *gcm* υποκινητή ή άλλου τύπου επικουρικά κύτταρα των αισθητηρίων οργάνων, όπου η *lacZ*, όταν η έκφρασή της ελέγχεται από τον υποκινητή του γονιδίου *prospero*, βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα. Αντίθετα, στα κύτταρα με τα χαμηλά επίπεδα *lacZ* και κατ' επέκταση με τη χαμηλή δραστηριότητα του υποκινητή του *prospero*, που αντιπροσωπεύουν τους νευρώνες (Gho et al 1999, Van der Bor and Giangrande 2001) ανιχνεύονται χαμηλά επίπεδα Hey.

Συμπερασματικά, σε όλους τους ιστούς που πραγματοποιήθηκε η ανάλυση του προτύπου έκφρασης του γονιδίου Hey, αυτό εκφράζεται αποκλειστικά σε νευρώνες. Το πρότυπο μάλιστα έκφραση του γονιδίου στο ΚΝΣ της προνύμφης υπαινίσσεται ότι η έκφραση του γονιδίου είναι έντονη αλλά παροδική, μιας και μπορεί να παρατηρείται μόνο σε νεογέννητους νευρώνες.



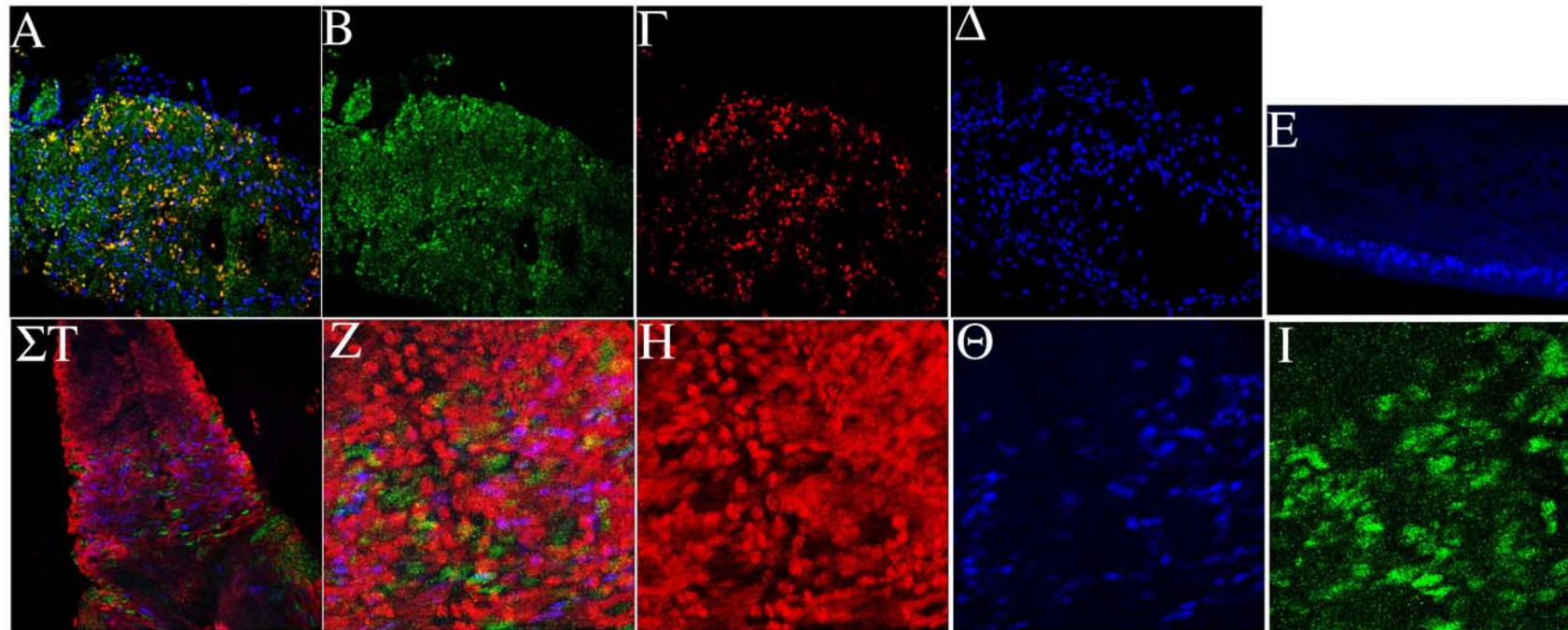
Εικόνα 32: Φτερά νύμφης 24 ωρών υπέστησαν ανοσοιστοχημική χρώση για Hey (σε όλα τα πλαίσια είναι η χρώση για Hey είναι μπλε). **A)** σε φτερά στελέχους *elavGal4-UASGFP* η GFP εκφράζεται σε όλους τούς νευρώνες. Η κυτταροπλασματική της κατανομή επιτρέπει την παρατήρηση των νευραξόνων. Σε όλα τα κύτταρα που είναι νευρώνες, ανιχνεύονται χαμηλά ποσά πρωτεΐνης Hey. **Δ)** φτερά στελέχους *gcm-lacZ*, όπου η *lacZ* (κόκκινη) ανιχνεύεται σε προδρόμους των κυττάρων γλοίας, δεν υπάρχει εντοπισμός της πρωτεΐνης Hey σε γλοία **H)** φτερά στελέχους *prospero-lacZ*, όπου η *lacZ* (κόκκινη) ανιχνεύεται σε όλα τα κύτταρα της γενεαλογίας των αισθητηρίων κυττάρων, η πρωτεΐνη Hey εντοπίζεται σε νευρώνες, όπου επίσης παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα *prospero-lacZ*. **B-Γ, E-Z, Θ-I)** διαχωρισμός των χρωμάτων των πλαισίων A, Δ, H αντίστοιχα.

6.5 Απόκριση του γονιδίου στο σήμα Notch.

Οι περισσότερες μελέτες που διερεύνησαν αν τα ομόλογα γονίδια των σπονδυλωτών αποκρίνονται στη σηματοδότηση Notch, κατέληξαν στη διαπίστωση ότι σε αρκετές περιπτώσεις η υπόθεση είναι αληθής. Στην προσπάθεια να εξεταστεί αν κάτι τέτοιο πράγματι ισχύει και στη *Drosophila*, αποφασίστηκε ότι η καλύτερη προσέγγιση θα ήταν να αναλυθεί το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου σε συνθήκες που αντιστοιχούν σε απενεργοποίηση του Notch μονοπατιού.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα στέλεχος ομόζυγο για ένα θερμοευαίσθητο αλληλόμορφο έλλειψης λειτουργίας του ενδογενούς γονιδίου Notch. Μετατόπιση και καλλιέργεια του συγκεκριμένου στελέχους από την επιτρέπουσα στη περιοριστική θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι αρκετή για την απενεργοποίηση του Notch μονοπατιού. Υπό αυτές τις συνθήκες εξετάστηκε το πρότυπο έκφρασης σε όλους τους ιστούς που αναφέρθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο.

Σε όλες τις περιπτώσεις (**Εικ. 33**) η έκφραση του Hey διατηρήθηκε, ενώ ταυτόχρονα η έλλειψη του Notch προκάλεσε τους αναμενόμενους φαινοτύπους, όπως αυτοί αποκαλύφθηκαν μετά από ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για κατάλληλες πρωτεΐνες-δείκτες ταυτότητας κυτταρικών τύπων. Στο έμβryo, απενεργοποίηση του μονοπατιού Notch σε πολύ αρχικό στάδιο προκαλεί υπερτροφία του ΚΝΣ, επιδεικνυόμενη από τα υπεράριθμα Elav θετικά κύτταρα, που μάλιστα καλύπτουν όλη την επιφάνεια του εμβρύου. Ανάμεσα σε αυτά υπάρχουν κάποια που συνεχίζουν να εκφράζουν Hey. Αν και δεν πραγματοποιήθηκε καμμία ποσοτική ανάλυση όσον αφορά στον αριθμό των θετικών για Hey κυττάρων είναι προφανές ότι η έκφραση του Hey παραμένει σε ένα υποσύνολο νευρώνων. Επίσης, ποτέ δεν παρατηρείται σε γλοία κύτταρα, θετικά για την έκφραση του Repo, υποδηλώνοντας έτσι ότι η έκφραση του γονιδίου είναι στενά συνυφασμένη με την αναπτυξιακή ταυτότητα των νευρώνων, ακόμα και υπό αυτές τις συνθήκες. Η έκφραση του Hey διατηρείται στο ΚΝΣ της προνύμφης και στο περιθώριο του φτερού της νύμφης μετά από έλλειψη λειτουργίας του Notch. Άρα η έκφραση του Hey στους συγκεκριμένους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια δε φαίνεται να εξαρτάται, υπό τις παρούσες πειραματικές συνθήκες, από τη σηματοδότηση Notch, αν και χρειάζεται περαιτέρω ανάλυση για τη διευκρίνιση της σχέσης Notch-Hey.



Εικόνα 33: Α-Δ)Ανοσοιστοχημική χρώση εμβρύων N^{ts} (μετατοπισμένα μετά από 4 ώρες ανάπτυξης στους 18°C και μεγαλωμένα για περίπου 20 περαιτέρω ώρες στην περιοριστική των 32°C) για Hey (κόκκινο), Elav (πράσινο), και Repo(μπλε). Η υπερτροφία του νευρικού συστήματος, λόγω της έλλειψης του Notch, είναι εμφανής. Υπό αυτές τις συνθήκες το Hey παραμένει σε κάποιους από τους νευρώνες. **Ε)** Αυξημένος είναι ο αριθμός των Hey νευρώνων κατά μήκος της L1 φλέβας φτερών 24 ωρών νύμφης στελέχους N^{ts} (συγκριση με Εικ. 10Γ), όταν η σηματοδότηση Notch δεν είναι ενεργή. **ΣΤ, Ζ, Η, Θ, Ι)** Στο τμήμα του θωρακικού γαγγλίου του ΚΝΣ προνύμφης στελέχους N^{ts}, δε φαίνεται να χάνεται η έκφραση του γονιδίου Hey (μπλε) από τους Elav (κόκκινο) νευρώνες. Οι νευροβλάστες φαίνονται πράσινοι για την παρουσία της A-sense πρωτεΐνης.

7 Συζήτηση (μέρος Α)

Οι δύο διακριτές, τόσο από δομικής όσο και από λειτουργικής απόψεως, ομάδες των bHLH πρωτεϊνών, των προνευρικών και των E(spl), όπου ανήκουν η πρωτεΐνη Scute και E(spl)m7 αντίστοιχα, ανταγωνίζονται μεταξύ τους κατά τη διάρκεια της νευρογένεσης. Οι μεν προνευρικές προάγουν τη νευρογένεση οι δε E(spl) πρωτεΐνες την καταστέλλουν. Η ανταγωνιστική σχέση μεταξύ τους έχει διατηρηθεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, καθώς παρατηρείται και στα θηλαστικά. Η ακριβής ωστόσο φύση του μηχανισμού αυτού δεν είχε διασαφηνιστεί. Ήταν γνωστό μέχρι στιγμής ότι οι E(spl) πρωτεΐνες κατέστειλαν τη δραστικότητα των προνευρικών πρωτεϊνών σε μεταγραφικό επίπεδο.

Εφαρμόζοντας τη τεχνική των Jimenez et al (1997), η οποία συνίσταται στη μετατροπή των E(spl)m7, E(spl)mγ και E(spl)mδ πρωτεϊνών από μεταγραφικούς καταστολείς σε μεταγραφικούς ενεργοποιητές, κατέστη δυνατή η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με ορισμένες πτυχές του τρόπου λειτουργίας των E(spl) πρωτεϊνών. Κατ' αρχάς έγινε σαφές ότι:

- οι E(spl) πρωτεΐνες καταστέλλουν τα γονίδια-στόχους των προνευρικών.
- Η ικανότητά τους αυτή βασίζεται τόσο στην πρόσδεσή τους σε E_B/E_C/N αλληλουχίες όσο και στην ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με ήδη προσδεδεμένα σε E_A αλληλουχίες ετεροδιμερή Da/Sc. Η αλληλεπίδρασή τους με το σύμπλοκο Da/Sc βασίζεται στην αλληλεπίδραση της αμινοτελικής περιοχής τους με την καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης Scute (παρούσα εργασία) και της περιοχής Orange με την αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης Da (Ιωάννα Ζαρίφη, αδημοσίευτα αποτελέσματα).
- Σε όλες τις περιπτώσεις, οι E(spl) φαίνεται να συμπεριφέρονται ως ενεργοί καταστολείς, διότι η κατασταλτική τους λειτουργία είναι πλήρως εξαρτημένη από την παρουσία του συγκαταστολέα Groucho. Η παρατήρηση αυτή μάλλον εκμηδενίζει τις πιθανότητες των E(spl) πρωτεϊνών να δρουν ως bHLH αρνητικοί ρυθμιστές κατηγορίας V, όπως για παράδειγμα η πρωτεΐνη Emc.

7.1 Στόχοι της δράσης των E(spl) πρωτεϊνών.

Αν και θεωρείται ότι οι E(spl) πρωτεΐνες καταστέλλουν τη νευρογένεση μέσω της καταστολής της μεταγραφής των προνευρικών πρωτεϊνών, στην παρούσα διατριβή αποδείχθηκε ότι στην περίπτωση των πρωτεϊνών E(spl)m7 (και E(spl)mγ) η κατασταλτική τους δράση επί της γένεσης των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων εκδηλώνεται ακόμη και παρουσία υψηλών επιπέδων, εξωγενώς παρεχόμενης προνευρικής πρωτεΐνης Scute (**Εικ. 8**). Η παραπάνω παρατήρηση είναι αληθής ακόμα και στο επίπεδο της δραστικότητας συγκεκριμένων γονιδίων,

ρυθμιζόμενων θετικά από ετεροδιμερή Da/Sc (**Εικ. 12**). Αυτό συνηγορείται από την παρατήρηση ότι οι υπερεκφραζόμενες E(spl) πρωτεΐνες δεν καταστέλλουν την ενδογενή έκφραση του γονιδίου *achaete*, αλλά καταστέλλουν πλήρως τα γονίδια στόχους των προνευρικών πρωτεϊνών, όπως αυτό αντανakλάται από την καταστολή των γονιδίων *SMC-lacZ*, *EE4-lacZ* (Culi and Modolell 1998, Giagtzoglou et al 2003)

Αν ληφθεί υπ' όψη ότι τα γονίδια *SMC-lacZ* και *EE4-lacZ* αντιπροσωπεύουν τη δραστικότητα βασικών αυτορυθμιστικών στοιχείων της έκφρασης των προνευρικών γονιδίων και μία απλουστευμένη έκδοσή τους αντιστοίχως, αμέσως γίνεται φανερό ότι υπάρχει ένα αρχικά παράδοξο φαινόμενο. Από τη μία τα γονίδια E(spl) δρουν μόνο επί των γονιδίων στόχων των προνευρικών αλλά από την άλλη είναι σίγουρο ότι δρουν και επί των ρυθμιστικών ενισχυτών των προνευρικών. Η υπερέκφραση του γονιδίου E(spl)^{m7} μειώνει την έκφραση του *ac* στο SOP, αλλά δε μειώνει το γενικότερο πρότυπο έκφρασης του στους προνευρικούς συναθροισμούς (**Εικ. 12**).

Η ερμηνεία που μπορεί να δοθεί για την παρατήρηση αυτή προκύπτει από την επισκόπηση της γονιδιακής ρύθμισης των προνευρικών γονιδίων στους προνευρικούς συναθροισμούς στον αναπτυξιακό δίσκο του φτερού. Το πρότυπο έκφρασης των προνευρικών γονιδίων σε όλα τα κύτταρα του προνευρικού συναθροισμού καθορίζεται αρχικά από τη συνδυασμένη δράση μεταγραφικών παραγόντων επί συγκεκριμένων ενισχυτών στη ρυθμιστική τους περιοχή. Σε αυτούς τους ενισχυτές δε δρα το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch και επομένως ούτε οι πρωτεΐνες E(spl) (Gomez-Skarmeta et al 1995). Η έκφραση των προνευρικών γονιδίων περιορίζεται τελικά μόνο στο πρόδρομο αισθητήριο όργανο που θα επιλεγεί μεταξύ των κυττάρων του προνευρικού συναθροισμού και αυτό στην ουσία επιτυγχάνεται μέσω του θετικά αυτορυθμιστικού ενισχυτή *SMC* του γονιδίου *scute*, στον οποίο προσδένονται τα ενεργοποιητικά ετεροδιμερή Da/Sc. Στα γειτονικά κύτταρα, τα οποία δεν ακολουθούν τελικά τη νευρική τύχη, "υποτασσόμενα" τελικά στο ανασταλτικό σήμα μέσω Notch, ο *SMC* ενισχυτής είναι ο πραγματικός στόχος των E(spl) πρωτεϊνών καταστέλλουν τη δράση του (Culi and Modolell 1998). Το ίδιο ισχύει και για ένα ενισχυτή του *achaete* γονιδίου (Martinez et al 1993). Όντας οι παραπάνω ενισχυτές αυτορυθμιστικοί, θα μπορούσε λοιπόν να θεωρηθούν ως μεταγραφικοί στόχοι των προνευρικών γονιδίων και κατ' επέκταση μία ειδική περίπτωση του συμπεράσματος ότι οι E(spl) πρωτεΐνες δρουν επί των γονιδίων στόχων των προνευρικών γονιδίων και όχι επί αυτών των ίδιων.

Η μετατροπή των E(spl) πρωτεϊνών σε μεταγραφικούς ενεργοποιητές με αντικατάσταση της περιοχής αλληλεπίδρασής τους με το συγκαταστολέα Groucho από την ισχυρή μεταγραφικά

ενεργοποιητική περιοχή VP16 και υπερέκφρασή τους σε γενετικό υπόβαθρο έλλειψης λειτουργίας των *achaete-scute* γονιδίων ενεργοποιεί το μονοπάτι της νευρογένεσης (Εικ. 16). Δεν είναι βέβαιο αν το επιτυγχάνουν μέσω της ενεργοποίησης όλων των εκείνων των απαραίτητων για τη νευρογένεση γονιδίων, που κανονικά ενεργοποιούνται από τα προνευρικά ή απλά ενεργοποιούν την έκφραση του *asense*, τα οποία μπορεί να δράσει ως προνευρικό γονίδιο (Dominguez and Campuzano 1993) ή/και άλλων γονιδίων, π.χ *lethal of scute* (που κανονικά δεν εκφράζεται στον αναπτυσσόμενο δίσκο του φτερού) και *senseless*, τα οποία με τη σειρά τους θα δρομολογήσουν τα ανάλογα κυτταρικά γεγονότα προς τη νευρογένεση. Δεν είναι με άλλα λόγια σίγουρο εάν στο συγκεκριμένο πείραμα, το αποτέλεσμα της υπερέκφρασης των χιμαιρικών E(spl) πρωτεϊνών διοχετεύεται μέσα από ένα ή περισσότερα γονίδια. Η εξακρίβωση αυτής της πιθανότητας είναι δυνατόν να γίνει εάν το ίδιο πείραμα πραγματοποιηθεί σε κύτταρα με έλλειψη λειτουργίας όλων των bHLH γονιδίων του γονιδιακού συμπλόκου *achaete-scute*.

7.2 Διπλός τρόπος δράσης των E(spl) πρωτεϊνών επί των γονιδίων στόχων.

Είναι σαφές από τα παραπάνω ότι η ενεργοποίηση γονιδίων από τα ετεροδιμερή Da/Sc συνεπάγεται την ύπαρξη αντίστοιχων E_A θέσεων πρόσδεσης στις ρυθμιστικές περιοχές τους. Στην παρούσα εργασία έγινε επίσης κατανοητό ότι οι ίδιες θέσεις, στις οποίες προσδένονται οι μεταγραφικοί ενεργοποιητές, είναι ικανές για την έμμεση πρόσδεση των E(spl) καταστολέων. Υπενθυμίζοντας ότι η πρόσδεση των E(spl) πρωτεϊνών σε αλληλουχίες E_B/E_C/N είναι πολύ καλά χαρακτηρισμένη, προτείνεται ότι οι E(spl) πρωτεΐνες είναι ικανές να προσδένονται στο DNA είτε άμεσα στις αλληλουχίες που έχουν προαναφερθεί ότι αναγνωρίζουν είτε έμμεσα στις E_A αλληλουχίες μέσω των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με τις προνευρικές πρωτεΐνες, χωρίς οι πιθανότητες αυτές να είναι αμοιβαία αποκλειόμενες.

Πράγματι, αποδείχθηκε, όπως προβλέπεται από ένα τέτοιο μοντέλο δράσης, ότι η ικανότητα πρόσδεσης στο DNA των E(spl) πρωτεϊνών δεν είναι απαραίτητη για τη στρατολόγηση τους από τις προνευρικές πρωτεΐνες (Εικ. 12, 13, 14). Η ικανότητά τους να καταστέλλουν το γονίδιο αναφοράς *EE4-lacZ* είναι άμεση συνάρτηση της ικανότητάς τους να αλληλεπιδρούν με τις προνευρικές πρωτεΐνες (Εικ. 12). Οι Alifragis et al (1997) είχαν διαπιστώσει διαφορές μεταξύ των διαφόρων E(spl) γονιδίων όσον αφορά την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τις προνευρικές πρωτεΐνες σε σύστημα δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα. Η E(spl)_{mδ}, συγκεκριμένα, δε φάνηκε να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Daughterless ή κάποια από τις προνευρικές πρωτεΐνες. Η έλλειψη της ικανότητας αυτής επιβεβαιώνεται και στο in vivo σύστημα, όπου πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα της παρούσας εργασίας. Η E(spl)_{mδ} δεν

είναι ικανή να καταστείλει τη δραστικότητα του *EE4-lacZ* γονιδίου αναφοράς (**Εικ. 12**), καθώς δεν είναι ικανή να στρατολογηθεί από τις προνευρικές πρωτεΐνες. Σε αντίθεση με την E(spl)mδ, οι πρωτεΐνες E(spl)m7 και E(spl)mγ είναι ικανές να αλληλεπιδρούν με τις προνευρικές πρωτεΐνες σε σύστημα δύο υβριδίων και να πετυχαίνουν in vivo την καταστολή του γονιδίου αναφοράς *EE4-lacZ* λόγω αυτής της ιδιότητάς τους (**Εικ. 12**). Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι στο μηχανισμό της έμμεσης πρόσδεσης των E(spl) πρωτεϊνών παίζουν βασικό ρόλο οι προνευρικές πρωτεΐνες Ac και Sc, αφού μεταλλαγές έλλειψης λειτουργίας στα γονίδια αυτά καταργούν τη στρατολόγηση των E(spl)VP16 πρωτεϊνών (**Εικ. 13**). Ενώ οι μεταλλαγές αυτές δεν επηρεάζουν την καθολικά εκφραζόμενη πρωτεΐνη Da, φαίνεται ότι αυτή δεν είναι ικανή για την προσέλκυση των E(spl) πρωτεϊνών από μόνη της, ίσως διότι δεν είναι ικανή να προσδεθεί σε E_A αλληλουχίες ως ομοδιμερές in vivo (καθώς προσδένεται παρά πολύ λίγο in vitro σύμφωνα με τους Jarman et al 1993) και να σχηματίσει την απαιτούμενη επιφάνεια αλληλεπίδρασης με τις E(spl) πρωτεΐνες.

Οι δύο μηχανισμοί με τους οποίους οι E(spl) πρωτεΐνες προσδένονται στο DNA δεν φαίνεται να είναι αμοιβαία αποκλειόμενοι. Θέσεις πρόσδεσης των E(spl) πρωτεϊνών βρίσκονται πάντα σε γειτονία με θέσεις πρόσδεσης των προνευρικών παραγόντων (Culi and Modolell 1998, Emery and Bier 1995, Jarman et al 1993; Ohsako et al., 1994; Van Doren et al. 1994). Είναι επίσης σημαντικό το γεγονός ότι η περιοχή πρόσδεσης των E(spl) πρωτεϊνών είναι ιδιαίτερα συντηρημένη εξελικτικά. Εάν η πρόσδεση στο DNA των πρωτεϊνών αυτών δεν ήταν απαραίτητη για τη λειτουργία τους θα αναμενόταν η έλλειψη εξελικτικής πίεσης να οδηγούσε στον εκφυλισμό της αντίστοιχης ιδιότητας. Επιπλέον, μία σειρά αποτελεσμάτων αποδεικνύει ότι τελικά οι E(spl) πρωτεΐνες είναι ικανές να προσδένονται στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων στόχων τους. Πιο αναλυτικά, η συνέκφραση E(spl)mδ και προνευρικής πρωτεΐνης Scute έχει ως αποτέλεσμα την μερική παρεμπόδιση των εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων (**Εικ. 8**). Αυτό ερμηνεύεται ως ότι η E(spl)mδ είναι ικανή να προσδένεται στις αντίστοιχες θέσεις πρόσδεσής της στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων-στόχων των προνευρικών ενεργοποιητών, αφού είναι ανίκανη για έμμεση πρόσδεση στο DNA μέσω των ήδη προσδεδμένων συμπλόκων. Παράλληλα, παρατηρήθηκε ότι υπερέκφραση της χιμαιρικής πρωτεΐνης E(spl)m7VP16 είναι ικανή να οδηγήσει στη δημιουργία, έστω περιορισμένου, αριθμού εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων απουσία των ενδογενών γονιδίων *achaete* και *scute* (**Εικ. 16**). Αντίθετα, μία μεταλλαγμένη έκδοση της παραπάνω χιμαιρικής πρωτεΐνης, η E(spl)m7KNEQVP16, η οποία έχει χάσει την ικανότητα της πρόσδεσης της στο DNA, δεν μπορεί να προκαλέσει το ίδιο αποτέλεσμα (**Εικ. 16**). Συμπερασματικά, οι E(spl) πρωτεΐνες είναι ικανές να προσδένονται στο DNA για την καταστολή των γονιδίων στόχων, αλλά ταυτόχρονα ορισμένες από αυτές κατέχουν την ιδιότητα να προσέρχονται στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων, των οποίων την

έκφραση καλούνται να ρυθμίσουν, μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες.

Το φαινόμενο των πολλαπλών τρόπων προσέλκυσης και επαφών κατά την γονιδιακή ρύθμιση από τις E(spl) πρωτεΐνες παρέχει τη δυνατότητα μίας εναλλακτικής θεώρησης από λειτουργικής απόψεως τόσο των E(spl) όσο και των προνευρικών πρωτεϊνών. Οι μεν δεν είναι μόνο καταστολείς αλλά και συγκαταστολείς, οι δε δεν είναι μόνο μεταγραφικοί ενεργοποιητές αλλά ταυτόχρονα είναι απαραίτητοι παράγοντες για τη μεταγραφική καταστολή των γονιδίων στόχων τους. Άλλωστε, πρέπει να υπενθυμιστεί ότι η διπλή αυτή φύση των μεταγραφικών παραγόντων παρατηρείται και σε άλλες περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα στις περιπτώσεις των πρωτεϊνών Dorsal και HNF4, που μπορεί να δράσουν σαν μεταγραφικοί καταστολείς υπό ορισμένες συνθήκες (Dubnikoff et al 1997, Ktistaki and Talianidis 1997), υποδηλώνοντας περαιτέρω ότι το φαινόμενο αυτό μπορεί να είναι ιδιαίτερα συχνό.

7.3 Ανάλυση του αλληλεπίδρασης των E(spl)m7 και της Sc πρωτεϊνών.

Η ακριβής φύση της ανταγωνιστικής λειτουργίας των δύο πρωτεϊνών φαίνεται να βασίζεται στην αλληλεπίδρασή τους. Η ανάλυση που εφαρμόστηκε για την ταυτοποίηση των περιοχών αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο πρωτεϊνών και τη διαλεύκανση της λειτουργίας τους οδήγησε στα παρακάτω συμπεράσματα:

- η καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης Scute είναι η, πιθανότατα η μόνη, περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής (**Εικ. 19**).
- η πρωτεΐνη Scute αλληλεπιδρά μέσω της τελικής, 25 αμινοξέων έκτασης, καρβοξυτελικής περιοχής, με την bHLH περιοχή της E(spl)m7 πρωτεΐνης (**Πίν. 3, Εικ. 18, 20**).
- επιβεβαιώνεται ότι η καταστολή μέσω E(spl)m7 είναι ενεργή, απαιτεί δηλαδή το συγκαταστολέα Groucho (**Εικ. 21**) και πιθανότατα να απαιτεί και την ακέραια περιοχή Orange (**Εικ. 21, 22**)
- η αλληλεπίδραση αυτή είναι σημαντική in vivo, όπως αποκαλύπτεται από την μελέτη ελάχιστων τεχνητών ενισχυτών, βάσει των οποίων μπορεί να απομονωθεί μία από τις πτυχές της σύνθετης γονιδιακής ρύθμισης που πιθανότατα πραγματοποιείται σε πιο περίπλοκους φυσικούς ενισχυτές (**Εικ. 23**).

7.4 Η σημασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης Scute και της bHLH περιοχής της πρωτεΐνης E(spl)m7.

Οι φυσικοί ενισχυτές είναι οργανωμένοι κατά τέτοιο τρόπο που ευνοείται η στρατολόγηση πολλαπλών πρωτεϊνικών παραγόντων, οι οποίοι τελικά θα συγκροτήσουν ένα ενισχυόσωμα. Η γονιδιακή ρύθμιση βασίζεται - μεταξύ άλλων - στη ρύθμιση της συγκρότηση και της λειτουργίας του ενισχυοσώματος (Merika and Thanos 2001). Για παράδειγμα, στην περίπτωση της γονιδιακής ρύθμισης από τις προνευρικές πρωτεΐνες, έχει ήδη περιγραφεί ότι στους ενισχυτές των γονιδίων στόχων τους μπορεί να παίζουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο πρωτεΐνες όπως οι Senseless (Nolo et al 2000, Jafar-Nejad et al 2003), Sis-a (Erickson and Cline, 1993) και οι μη ταυτοποιημένοι ακόμα παράγοντες που προσδένονται σε αλληλουχίες α και β, όπως αυτές που βρίσκονται στον ενισχυτή SMC του γονιδίου *scute* (Culi et al 1998).

Η σημασία των 25 καρβοξυτελικών αμινοξέων της πρωτεΐνης Scute είχε, μέχρι στιγμής, υποτιμηθεί, αν και η περιοχή αυτή είναι εξελικτικά συντηρημένη όχι μόνο μεταξύ διαφόρων πρωτεϊνών-μελών της οικογένειας των προνευρικών αλλά και με ομόλογες πρωτεΐνες από άλλα Φύλα (Εικ. 19). Οι Hinz et al (1994) προτείνουν ότι η περιοχή αυτή δεν είναι απαραίτητη για τη λειτουργία μίας άλλης προνευρικής πρωτεΐνης, της L'sc. Πιο συγκεκριμένα, ένα διαγονίδιο που αποτελείται μόνο από τη βασική περιοχή πρόσδεσης στο DNA της πρωτεΐνης L'sc, είναι ικανό να προωθήσει την δημιουργία εκτοπικών αισθητηρίων οργάνων στην ίδια περίπου έκταση με την αγρίου τύπου, πλήρους μήκους, πρωτεΐνη. Η ερμηνεία που δόθηκε ήταν ότι αρκεί η βασική περιοχή της πρωτεΐνης L'sc, ώστε αυτή να μπορέσει να ετεροδιμεριστεί με την πρωτεΐνη Da. Το ετεροδιμερές των Da/L'sc θα μπορούσε να προσδεθεί σε ρυθμιστικές αλληλουχίες γονιδίων στόχων και να συντονίσει τη συγκρότηση του ενισχυοσώματος που θα ενεργοποιούσε την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων, που με τη σειρά της θα προκαλούσε την εκτοπική ανάπτυξη των αισθητηρίων οργάνων.

Τα αποτελέσματα των Hinz et al (1994) εν μέρει επιβεβαιώνονται από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Εάν, με σκοπό να εκτιμηθεί ο ρόλος της περιοχής ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Scute, χρησιμοποιηθεί το ίδιο πειραματικό σύστημα (το οποίο βασίζεται στην ανάπτυξη εκτοπικών αισθητηρίων οργάνων στο θώρακα του ενήλικου ατόμου *Drosophila*, όταν υπερεκφράζονται συγκεκριμένα διαγονίδια), το αποτέλεσμα είναι ότι η μεταλλαγμένες πρωτεΐνες Sc₁₋₂₆₀ και Sc₁₋₂₉₀ είναι ικανές στον ίδιο βαθμό με του αγρίου τύπου, πλήρους μήκους, πρωτεΐνη Sc, να προωθήσουν την ανάπτυξη εκτοπικών αισθητηρίων οργάνων (Εικ. 23), όμοια με ότι συμβαίνει με τη L'sc. Το ίδιο ικανές είναι επίσης στο να ενεργοποιήσουν την έκφραση γονιδίων ανταποκριτών από φυσικούς ενισχυτές, όπως ο εγγύς υποκινητής του γονιδίου *achaete* (Εικ.

23). Ωστόσο, φαίνεται ότι η τελική περιοχή της πρωτεΐνης Scute παίζει ιδιαίτερο ρόλο τόσο στην ενεργοποίηση της μεταγραφής όσο και στην καταστολή της (από το προσελκούμενο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα καταστολέων, κυρίως αποτελούμενο από τις πρωτεΐνες E(spl)m7 και Groucho), όταν η δράση της εκτιμάται σε διαφορετικό πειραματικό σύστημα, το οποίο βασίζεται στη χρήση απλουστευμένων ρυθμιστικών στοιχείων έκφρασης γονιδίων αναφοράς (*UAS-tk-luc* και *EE4-lacZ*) in vivo (Εικ. 19, 20).

Η παραπάνω αντίθεση ουσιαστικά πιθανότατα οφείλεται στη φύση των υπό μελέτη ενισχυτών. Η ακρίβεια και η ειδικότητα στη ρύθμιση της απόκρισης των γονιδίων στόχων στις εντολές μεταγραφής από το ενισχυόσωμα επιτυγχάνεται ακριβώς επειδή στο ενισχυόσωμα κατά κανόνα επικρατούν πολύπλευρες και πολυδύναμες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες ευνοούνται στην περίπτωση των σύνθετων φυσικών ενισχυτών. Έχει επίσης ήδη τονιστεί ότι η διάταξη, ο αριθμός και η απόσταση των θέσεων πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων σε ένα φυσικό ενισχυτή προσθέτει ακόμα ένα επίπεδο ελέγχου στη ρύθμιση της μεταγραφής. Συνεπώς, όταν χρησιμοποιούνται απλουστευμένα στοιχεία αναφοράς, όπως το *UAS-tk-luc* στα πειράματα παροδικής διαμόλυνσης ή το *EE4-lacZ* στα in vivo πειράματα ανοσοιστοχημικής χρώσης, η περιπλοκότητα της ρύθμισης μειώνεται λόγω της αντίστοιχης μείωσης στον αριθμό των πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την απόκριση των αντίστοιχων γονιδίων. Με αυτόν τον τρόπο, μπορεί κανείς να απομονώσει μία συγκεκριμένη πρωτεϊνική περιοχή και να αποδώσει σε αυτή συγκεκριμένο ρόλο, όπως έγινε με την ταυτοποίηση της καρβοξυτελικής περιοχής της πρωτεΐνης Scute ως περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης και αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη E(spl)m7. Αντίθετα, όταν η δράση των διάφορων παραγόντων εκτιμάται είτε με το αποτέλεσμα μιας ολόκληρης αναπτυξιακής διαδικασίας, δηλαδή της ανάπτυξης εξωτερικών αισθητηρίων οργάνων, στην οποία μάλιστα ακόμα δεν έχουν διευκρινιστεί σε μεγάλο ποσοστό τα γονίδια τα οποία παίζουν ρόλο είτε με την απόκριση ενός σύνθετου ενισχυτή όπως ο *SMC* ή ο εγγύς υποκινητής του γονιδίου *achaete*, τότε πρέπει να ληφθεί υπ' όψη ότι εξετάζεται συνολικά η δράση ενός ολόκληρου ενισχυοσώματος, που πιθανότατα έχει την ικανότητα να παρακάμπτει τη λειτουργία μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης ή περιοχής.

Η εξελικτική συντήρηση της καρβοξυτελικής περιοχής της Scute πιθανότατα αντιπροσωπεύει τη συντήρηση της λειτουργίας της, και σε άλλες πρωτεΐνες-μέλη της ευρύτερης οικογένειας των προνευρικών πρωτεϊνών, στη *Drosophila* και στα σπονδυλωτά. Αν και τίποτα δεν έχει βρεθεί ακόμα για τη καρβοξυτελική περιοχή της Mash1 πρωτεΐνης, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι πρωτεϊνική αλληλεπίδραση μεταξύ Mash1 και Hes1 πρωτεϊνών είναι υπεύθυνη για την ανταγωνιστική τους δράση. Οι Castella et al (1999) έδειξαν ότι η Mash1 προωθεί και η Hes1 καταστέλλει την νευρική διαφοροποίηση καλλιιεργούμενων νευρικών

προδρόμων κυττάρων αρουραίου. Η συνέκφρασή τους επίσης καταστέλλει τη διαφοροποίηση των κυττάρων, γεγονός που αποδεικνύει ότι ο ανταγωνισμός επιτελείται σε μετά-μεταγραφικό επίπεδο. Η ικανότητα της Hes1 πρωτεΐνης να ανταγωνίζεται τη Mash1 δεν εξαρτάται από την ικανότητά της να προσδένεται στο DNA και γι' αυτό το λόγο μπορεί να υποθεθεί ότι είναι αρκετό να αλληλεπιδράσει η Hes1 με την περιοχή της μεταγραφικής ενεργοποίησης της Mash1 για να ασκήσει τη κατασταλτική της λειτουργία.

Από την άλλη μεριά, τίθεται το ερώτημα σχετικά με τα μέλη μιας συγκεκριμένης υποοικογένειας προνευρικών πρωτεϊνών, της Ato/Ngn υποοικογένειας, που φαίνεται να στερείται της συγκεκριμένης πρωτεϊνικής αλληλουχίας (Quan et al 1994, Hassan and Bellen 2000). Αν και η περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής δεν έχει ανακαλυφθεί ακόμα στις πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας, θα ήταν εξαιρετικά ενδιαφέρον αν επίσης η αλληλεπίδρασή τους με E(spl) πρωτεΐνες σχετιζόταν με την καταστολή της δράσης τους στη διαδικασία της νευρικής διαφοροποίησης. Μέχρι στιγμής, η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Atonal με δύο διαφορετικές E(spl) πρωτεΐνες σε σύστημα δύο υβριδίων (Alifragis et al 1997) δείχνει προς αυτή την κατεύθυνση.

Αναφορικά με την ειδικότητα της αλληλεπίδρασης από τη μεριά των E(spl) πρωτεϊνών, είναι φανερό ότι αυτή περιορίζεται μόνο σε ορισμένα μέλη του συμπλόκου, όπως έχει δείξει αρχικά από την ανάλυση σε σύστημα δύο υβριδίων (Alifragis et al 1997) και *in vivo* (Giagtzoglou et al 2003). Είναι ιδιαίτερα σημαντικό όμως, ότι η περιοχή αλληλεπίδρασης της E(spl)m7 πρωτεΐνης χαρτογραφείται στην περιοχή bHLH και όχι στην Orange περιοχή. Η τελευταία είναι σημαντική για τη λειτουργία των HES πρωτεϊνών (Dawson et al 1995, Castella et al 2000). Οι Dawson et al (1995) προτείνουν βάσει πειραμάτων ανταλλαγής περιοχών μεταξύ των πρωτεϊνών E(spl)m8 και Hairy ότι η πρωτεΐνη Hairy είναι ικανή να καταστείλει την διαμεσολαβούμενη από Sc ενεργοποίηση του πρώιμου υποκινητή του γονιδίου *Sxl*, διότι μπορεί να αλληλεπιδρά μέσω της Orange περιοχής της με την πρωτεΐνη Sc. Ο ίδιος υποκινητής δεν μπορεί να κατασταλεί από την πρωτεΐνη E(spl)m8. Η παραπάνω ερμηνεία μπορεί να μην είναι σωστή. Οι Alifragis et al (1997) έδειξαν ότι ούτε η Hairy ούτε η E(spl)m8 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Scute σε σύστημα δύο υβριδίων. Υπό αυτές τις προϋποθέσεις, είναι πιθανό η ειδικότητα της καταστολής του πρώιμου υποκινητή *Sxl* από τη πρωτεΐνη Hairy να βασίζεται στην μέσω Orange αλληλεπίδραση με άλλους ενεργοποιητές που είναι γνωστό ότι δρουν πάνω στον υποκινητή, π.χ. η πρωτεΐνη Sis-a (Erickson and Cline 1993). Η υπόθεση αυτή ισχυροποιείται, εάν ληφθεί υπ' όψη ότι η πρωτεΐνη E(spl)m8 ασκεί την κατασταλτική της δράση επί της διαδικασίας της νευρογένεσης, κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασής της με την πρωτεΐνη Senseless (Jafar-Nejad et al 2003). Η αλληλεπίδραση πραγματοποιείται μέσω της Orange

περιοχής της E(spl)m8. Η μεταλλαγή ορισμένων αμινοξέων της περιοχής Orange της E(spl)m7, συντηρημένων μεταξύ E(spl)m7 και E(spl)m8 δεν επηρέασε καθόλου την αλληλεπίδραση μεταξύ E(spl)m7 και Scute και συνεπώς η κατασταλτική δραστηριότητα της E(spl)m7 παρέμεινε στα ίδια επίπεδα, ενώ μεταλλαγές των αμινοξέων αυτών στην αλληλουχία της E(spl)m8 κατήργησαν την αλληλεπίδρασή της με τη Senseless πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα αυτή ωθούν προς τη σκέψη ότι, γενικότερα ίσως οι Hes πρωτεΐνες, να έχουν αναπτύξει πολλαπλές περιοχές πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, οι οποίες θα διευκολύνουν τη στρατολόγησή τους και τη σταθεροποίησή τους στα σχηματισμένα πάνω σε φυσικούς ενισχυτές ενισχυσώματα. Μπορούν να αλληλεπιδρούν με τις προνευρικές πρωτεΐνες μέσω της bHLH περιοχής και με άλλους ενεργοποιητές, πως η πρωτεΐνη Senseless ή Sis-a ή Da (Ιωάννα Ζαρίφη, αδημοσίευτα αποτελέσματα) μέσω της Orange περιοχής.

Πάντως, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την υπερέκφραση της πρωτεΐνης E(spl)m7bHLHVP16 (στην οποία λείπει η Orange περιοχή) και τη χρήση της E(spl)m7ΔOrange πρωτεΐνης σε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης S2 κυττάρων υποδεικνύουν ένα πιθανό ρόλο για την Orange περιοχή. Προκαταρκτικά αποτελέσματα από πειράματα υστέρησης ηλεκτροφορητικής κινητικότητας με μεταφρασμένη *in vitro* πρωτεΐνη E(spl)m7ΔOrange δείχνουν ότι η Orange περιοχή είναι απαραίτητη για το διμερισμό των E(spl) πρωτεϊνών και (άρα) για την πρόσδεσή τους στο DNA (Κωστής Κουμπανάκης, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Στην περίπτωση βέβαια της *in vivo* υπερεκφραζόμενης E(spl)m7bHLHVP16 παρατηρείται ότι αυτή μπορεί να διμεριστεί, να προσδεθεί στο *GbeB1* ενισχυτή και να τον ενεργοποιήσει. Η υπερέκφρασή της, καθώς και η παρουσία της VP16 δυνατής ενεργοποιητικής περιοχής μπορεί ίσως να καλύπτει διαφορές με την πλήρους μήκους E(spl)m7VP16 στη δύναμη πρόσδεσης στον εν λόγω ενισχυτή. Παρ' όλα αυτά, προκαλεί εντύπωση το γεγονός ότι η bHLH περιοχή δεν μπορεί να ενεργοποιήσει τον *EE4* ενισχυτή *in vivo*. Παράλληλα, αν και η πρωτεΐνη E(spl)m7Δorange δεν ανιχνεύθηκε ποτέ ανοσολογικά σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα διαμολυσμένων κυττάρων, η παραδοχή της υποτιθέμενης λειτουργικότητας της και σε συνδυασμό με τα *in vivo* δεδομένα παραπέμπει στο συμπέρασμα ότι συνολικά η περιοχή Orange μπορεί να επιτελεί σημαντικό σταθεροποιητικό ρόλο για τη διαμόρφωση του μορίου ή ακόμα και ρυθμιστικό επί των ενδομοριακών ή/και διαμοριακών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της E(spl)m7.

Από τη στιγμή που η E(spl)m7 αλληλεπιδράσει με την πρωτεΐνη Scute και προσελκυθεί στη ρυθμιστική αλληλουχία του εκάστοτε υπό μελέτη γονιδίου, φαίνεται ότι απαιτείται ακόμα ένα στάδιο για τη επίτευξη της μεταγραφικής καταστολής, το οποίο δεν είναι άλλο από τη στρατολόγηση του συγκатаστολέα Groucho (Εικ. 17, 21).

7.5 Συνέπειες για τον μηχανισμό της πλευρικής αναστολής.

Οι φυσικοί ενισχυτές στόχοι των προνευρικών γονιδίων περιέχουν πολλών τύπων αλληλουχίες για την πρόσδεση των E(spl) πρωτεϊνών, των προνευρικών ενεργοποιητών αλλά και άλλων παραγόντων, ταυτοποιημένων και μη. Ορισμένοι από αυτούς τους ενισχυτές εκφράζονται μόνο στον νευρικό πρόδρομο κύτταρο π.χ. των γονιδίων *asense*, *senseless*, *deadpan*, ενώ άλλοι εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα του προνευρικού συναθροισμού π.χ. *scabrous*, αν και η ποιοτική σύσταση τους σε θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων δε διαφέρει μεταξύ τους. Εφ' όσον οι πρωτεΐνες E(spl) είναι δυνατόν να στρατολογούνται σε Εα θέσεις πρόσδεσης από τις προνευρικές, πως επιτυγχάνεται η ειδικότητα της απόκρισης ορισμένων φυσικών ενισχυτών στην παρουσία των E(spl) πρωτεϊνών?

Για παράδειγμα, ο τεχνητός ενισχυτής *EE4*, αν και αποκαταστέλλεται κατά την απουσία των ενδογενών E(spl) πρωτεϊνών, που σημαίνει ότι υπό κανονικές συνθήκες ρυθμίζεται από αυτές, κανονικά εκφράζεται εξίσου σε όλα τα κύτταρα ενός προνευρικού συναθροισμού. Από την άλλη μεριά, ένας διαφορετικός τεχνητός ενισχυτής, ο *SRVN-Δ147-181*, που αποτελεί μεταλλαγμένη έκδοση του *SMC* ενισχυτή κατά την έννοια ότι, όπως και ο *EE4* ενισχυτής, στερείται πλήρως των θέσεων πρόσδεσης των E(spl) πρωτεϊνών, εκφράζεται μόνο στο μελλοντικό ΠΑΟ και καθόλου στα γειτονικά κύτταρα του προνευρικού συναθροισμού, ανταποκρίνεται δηλαδή στη σηματοδότηση Notch (Culi and Modolell 1998). Στην περίπτωση αυτή, η προφανώς μεγαλύτερη πολυπλοκότητα του ενισχυτή παραπέμπει στην υπόθεση ότι η πρόσδεση επιπρόσθετων, μη ταυτοποιημένων, παραγόντων στον εν λόγω ενισχυτή ευνοεί τελικά το σχηματισμό μεταγραφικά κατασταλτικών πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων στα E(spl) περιέχοντα κύτταρα. Πιθανές θέσεις πρόσδεσης για τέτοιους παράγοντες μπορεί να είναι οι αλληλουχίες τύπου α και β, όπως χαρακτηριστικά έχουν ονομαστεί από τους Culi and Modolell (1998), οι οποίες μάλιστα είναι εξελικτικά συντηρημένες (Culi and Modolell 1998). Μερικά μάλιστα από τα πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί για τον *EE4* ενισχυτή έχουν διεξαχθεί και με ένα άλλο παρόμοιο συνθετικό ενισχυτή, τον *EEα4*. Η γενικότερη απόκριση του είναι ίδια ποιοτικά με τον ενισχυτή *EE4*, αλλά ποσοτικά φαίνεται να είναι ιδιαίτερος πιο έντονη. Υπάρχουν μάλιστα (αδημοσίευτα) δεδομένα σύμφωνα με τα οποία μπορεί να υποθεθεί ότι ο παράγοντας που προσδένεται στην αλληλουχία τύπου α να αλληλεπιδρά με το συγκαταστολέα Groucho. Άλλωστε είναι γνωστό ότι ο συγκαταστολέας Groucho είναι ικανός να αλληλεπιδρά με πολλούς παράγοντες για να αποκτήσει πρόσβαση στον υπό ρύθμιση ενισχυτή (Valentine et al 1998).

Άρα η ακριβής θέση και διάταξη των θέσεων πρόσδεσης των διάφορων ρυθμιστικών παραγόντων παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των αντίστοιχων πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων και στην τελική ρύθμιση της γονιδιακής απόκρισης στο σήμα της πλευρικής αναστολής. Από αυτή την άποψη, η αλληλεπίδραση των *E(spl)* και προνευρικών πρωτεϊνών, μπορεί να ευνοείται μόνο υπό κατάλληλες προϋποθέσεις και να έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό τριτοταγών συμπλόκων πρωτεϊνών-DNA, που επηρεάζουν περαιτέρω τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων της μεταγραφικής μηχανής. Θεωρητικά, οι *E(spl)* πρωτεΐνες μπορεί να δρουν *in vivo* με οποιοδήποτε από τους δύο τρόπους (ή και με τους δύο) που περιγράφηκαν παραπάνω. Ακόμα πιο ενδιαφέρον πάντως εμφανίζεται το ενδεχόμενο, να προσδένονται αρχικά στις αντίστοιχες θέσεις πρόσδεσής τους και σε "δεύτερο χρόνο" να ενισχύεται η πρόσδεσή τους κατά τρόπο συνεργατικό μέσω των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με τους παρακείμενους μεταγραφικούς ενεργοποιητές. Η στενή γειτονία που παρατηρείται μεταξύ των θέσεων πρόσδεσης των *E(spl)* και των προνευρικών πρωτεϊνών συνηγορεί προς αυτή την κατεύθυνση. Η κύρια συνέπεια της συνεργατικότητας δε θα μπορούσε να είναι άλλη από έντονη μεταγραφική απόκριση των γονιδίων στόχων των προνευρικών πρωτεϊνών στα ευμετάβλητα ενδογενή επίπεδα των *E(spl)* πρωτεϊνών που μεταδίδουν το σήμα της πλευρικής αναστολής.

7.6 Μελλοντικές προοπτικές.

Αφού τα γονίδια *E(spl)* δρουν επί των γονιδίων-στόχων των προνευρικών, η ανακάλυψή τους θα δια φωτίσει άγνωστες πτυχές της νευρογένεσης αλλά και εν γένει της γονιδιακής ρύθμισης. Η ειδικότητα και αποτελεσματικότητα της τελευταίας φαίνεται επίσης να είναι συνάρτηση της αλληλεπίδρασης των *E(spl)* πρωτεϊνών τόσο με την πρωτεΐνη *Da*, μέσω της περιοχής *Orange* των πρώτων και της αμινοτελικής περιοχής ενεργοποίησης της τελευταίας (Ιωάννα Ζαρίφη αδημοσίευτα αποτελέσματα), όσο και με την πρωτεΐνη *Scute*. Περαιτέρω ανάλυση μπορεί να αποκαλύψει κάποιο ιδιαίτερο ρόλο της, συντηρημένης εξελικτικά, περιοχής *Orange* στη ρύθμιση της μεταγραφής, πέρα από το διμερισμό. Τέλος, διεξάγονται ήδη προσπάθειες για την ταυτοποίηση επιπρόσθετων παραγόντων που μπορεί να εμπλέκονται στη ρύθμιση των προνευρικών γονιδίων από το *Notch* σηματοδοτικό μονοπάτι, π.χ. του α παράγοντα.

8 Συζήτηση (μέρος Β)

8.1 Το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου Hey.

Η εξέταση του προτύπου έκφρασης της πρωτεΐνης Hey πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ορού ποντικών, ανοσοποιημένων για την πρωτεΐνη, που προηγουμένως είχε παραχθεί και απομονωθεί από βακτήρια *E.coli*. Το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου αποκαλύφθηκε ως ιδιαίτερα δυναμικό και πιο σημαντικά, ειδικό για υποσύνολο νευρώνων του ΚΝΣ και του ΠΝΣ (Εικ. 24 - 32).

Ιδιαίτερα, η έκφραση του γονιδίου στο θωρακικό γάγγλιο του ΚΝΣ της προνύμφης του τρίτου σταδίου, η σύγκριση της θέσης και του μεγέθους των θετικών για την πρωτεΐνη Hey κυττάρων σε σχέση με τη θέση και το μέγεθος των νευροβλαστών (θετικών για την *E(spl)mg* πρωτεΐνη) και τη θέση και το μέγεθος των σωμάτων των νευρώνων (θετικών για την παρουσία του αντιγόνου *Elav*) οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη Hey εκφράζεται έντονα αλλά παροδικά σε κάποιους νεοδημιουργηθέντες νευρώνες και εξαφανίζεται με την πάροδο του χρόνου και την ωρίμανση των νευρώνων (Εικ. 31).

8.2 Το γονίδιο Hey ως άμεσος μεταγραφικός στόχος του Notch.

Το πείραμα που πραγματοποιήθηκε για να απαντηθεί η ερώτηση εάν το γονίδιο Hey είναι άμεσος μεταγραφικός στόχος του μονοπατιού Notch στηρίχθηκε στη χρήση ενός θερμοευαίσθητου αλληλομόρφου του γονιδίου *Notch*. Στελέχη *Drosophila*, ομόζυγων για το συγκεκριμένο αλληλόμορφο, αναπτύχθηκαν σε περιοριστική θερμοκρασία και στη συνέχεια εξετάστηκε η κατανομή της πρωτεΐνης τόσο σε έμβρυα όσο και στο ΚΝΣ της προνύμφης και στο ΠΝΣ της αρχικών σταδίων της νύμφης. Σε όλες τις περιπτώσεις, ενώ η υπερπλασία του νευρικού συστήματος επιβεβαιώνει την έλλειψη λειτουργίας του μονοπατιού Notch, η πρωτεΐνη Hey συνεχίζει να είναι παρούσα. Συνεπώς, η έκφρασή της δεν ρυθμίζεται από τη σηματοδότηση Notch, όπως άλλωστε συμβαίνει σε αρκετές περιπτώσεις σύμφωνα με μελέτες σε σπονδυλωτά (βλ. εισαγωγή), με τις παρακάτω βέβαια έντονες επιφυλάξεις:

- Η μεταλλαγή N^{ts} που χρησιμοποιήθηκε δεν είναι μεταλλαγή πλήρους έλλειψης λειτουργίας. Μπορεί κάποια βασική δραστηριότητα του γονιδίου να παραμένει ακόμα και μετά την πολύωρη ανάπτυξη των προνυμφών πρώτου σταδίου σε προνύμφες τρίτου σταδίου ή κατά τις 24 πρώτες ώρες της ανάπτυξης των νυμφών. Ειδικά μάλιστα για τα έμβρυα, θα μπορούσε επιπροσθέτως να υπάρχει δόση Notch μητρικής προέλευσης. Σε όλες τις περιπτώσεις, η εναπομένουσα Notch λειτουργία μπορεί να μην είναι ικανή να συντονίσει τη σωστή ανάπτυξη του νευρικού συστήματος, είναι όμως πιθανό να αρκεί για την διατήρηση της έκφρασης του

γονιδίου Hey. Σε αυτή την περίπτωση, θα έπρεπε να εξεταστεί η έκφραση του γονιδίου σε διάφορα γενετικά υποστρώματα πλήρους έλλειψης λειτουργίας Notch, ιδανικά δε να εξεταστεί σε κλώνους κυττάρων που είναι ομόζυγα για μεταλλαγές έλλειψης λειτουργίας, ώστε να αποφευχθεί η γενικότερη επίδραση της έλλειψης σηματοδότησης στην ανάπτυξη του οργανισμού.

- Η πρωτεΐνη Hey έχει υπό αυτές τις γενετικές συνθήκες μεγάλη διάρκεια ζωής αλλά ουσιαστικά η μεταγραφή του γονιδίου έχει διακοπεί. Η εξακρίβωση αυτής της πιθανότητας θα ήταν δυνατή μετά από σύγκριση του προτύπου έκφρασης της πρωτεΐνης με το πρότυπο έκφρασης του αντίστοιχου mRNA του γονιδίου στις ίδιες συνθήκες. Η in vivo μελέτη της δραστηριότητας του υποκινητή με τη βοήθεια γονιδίων αναφοράς είναι μία επιπλέον μέθοδος της εξακρίβωσης της σχέσης σηματοδότησης Notch και έκφρασης γονιδίου Hey. Η επισκόπηση πάντως του γενώματος της *Drosophila* με τη βοήθεια αλγορίθμου SCORE με σκοπό την ταυτοποίηση πιθανών γονιδίων στόχων του μεταγραφικού παράγοντα Su(H), και άρα του μονοπατιού Notch, έδειξε ότι στο δεύτερο εσόνιο του γονιδίου Hey βρίσκεται σύμπλεγμα θέσεων πρόσδεσης Su(H) (Rebeiz et al 2002).

- Η σηματοδότηση Notch μπορεί να συνδέεται με την έκφραση του γονιδίου σε μια πιο συγκεκριμένη αναπτυξιακή διαδικασία, αυστηρά ορισμένης χωρικά και χρονικά, όπως για παράδειγμα ο καθορισμός της κυτταρικής τύχης σε μία πολύ συγκεκριμένη γενεαλογία νευρικών κυττάρων. Ίσως επιβάλλεται η πιο λεπτομερής χωροχρονική ανάλυση του προτύπου έκφρασης του γονιδίου Hey ιδιαίτερα σε νευρώνες των οποίων η ταυτότητα μπορεί εύκολα να πιστοποιηθεί, δίνοντας προτεραιότητα σε γενεαλογίες που εξαρτώνται σε κάποιο στάδιο από σηματοδότηση Notch.

- Η γενικότερη έκφραση του γονιδίου μπορεί να εξαρτάται από πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια, των οποίων η πιθανή εξισοροπητική δράση δεν επιτρέπει την παρατήρηση οποιαδήποτε μεταβολών στο επίπεδο βέβαια της ανάλυσης που εφαρμόστηκε στη παρούσα εργασία.

8.3 Η λειτουργία του γονιδίου Hey.

Καθώς το πρότυπο έκφρασης του γονιδίου Hey περιορίζεται στο νευρικό σύστημα, φαίνεται να μην έχει συντηρηθεί ο ρόλος του στη καρδιογένεση. Με πειράματα εκτοπικής υπερέκφρασης είτε κωδικού είτε dsRNA (RNAi) in vivo εκτιμήθηκε, μετά από κατάλληλες ανοσοιστοχημικές χρώσεις, ο αριθμός και η μορφολογία των νευρώνων, καθώς και το πρότυπο έκφρασης το γονιδίου *asense* σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια και ιστούς, κυρίως στο ΚΝΣ του

τρίτου προνυμφικού σταδίου. Δεν παρατηρήθηκε καμμία μεταβολή στις παραπάνω ιδιότητες σε καμμία από τις εξεταζόμενες περιπτώσεις. Σε ορισμένες περιπτώσεις με τη χρήση συγκεκριμένων GAL4 στελεχών, είτε για την υπερέκφραση Hey είτε dsRNA, παρατηρείται θνησιμότητα. Κανένα ασφαλές συμπέρασμα δεν μπορεί να διατυπωθεί για τη λειτουργία του γονιδίου *in vivo*.

Η ανάλυση έχει παρεμποδιστεί από το γεγονός ότι δεν υπάρχουν απομονωθεί μεταλλαγές του γονιδίου, παρά το γεγονός ότι ολοένα αυξανόμενος αριθμός γονιδίων μεταλλάσσεται μέσω μιας συντονισμένης συνεχούς προσπάθειας με P μεταθετά στοιχεία. Είναι πιθανό η συγκεκριμένη περιοχή να είναι cold-spot για ένθεση P μεταθετών στοιχείων.

Περαιτέρω ανάλυση θα εστιαστεί στη μελέτη των θετικών για Hey νευρώνων και στη λεπτομερέστερη ανάλυση των φαινοτύπων που προκύπτουν με την υπερέκφραση του γονιδίου ή του dsRNA. Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει η πιθανότητα να υπάρχει συνέργεια με τις E(spl) πρωτεΐνες, καθώς φαίνεται (χωρίς να έχει τεκμηριωθεί επακριβώς) ότι και ορισμένες μπορεί να εκφράζονται σε κάποιους μεταμιτωτικούς νευρώνες.

9 Βιβλιογραφία.

1. Alifragis P, Poortinga G, Parkhurst SM, Delidakis C (1997) A network of interacting transcriptional regulators involved in *Drosophila* neural fate specification revealed by the yeast two-hybrid system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 13099-13104.
2. Amoutzias GD, Robertson DL, Oliver SG and Bornberg-Bauer E (2004). Convergent evolution of gene networks by single gene duplications in higher eukaryotes. *Embo Reports* 5: 1-6
3. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. (1999). Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science* 284:770–776.
4. Artavanis-Tsakonas, S. and Simpson, P. (1991). Choosing a cell fate: a view from the *Notch* locus. *Trends Genet.* 7, 403-408.
5. Bailey, A. M. and Posakony, J. W. (1995). Suppressor of Hairless directly activates transcription of *Enhancer* of *split* Complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes Dev.* 9, 2609-2622.
6. Bang, A.G., A.M. Bailey, and J.W. Posakony. 1995. *Hairless* promotes stable commitment to the sensory organ precursor cell fate by negatively regulating the activity of the *Notch* signaling pathway. *Dev. Biol.* 172: 479–494.
7. Baron M., H. Aslam, M. Flasz, M. Fostier, J. E. Higgs, S. L. Mazaleyrat and M. B. Wilkin (2002) Multiple levels of Notch signal regulation. *Molecular Membrane Biology* 19, 27-38
8. Bertrand N, Castro DS, Guillemot F (2002) Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 3: 517-530.
9. Bessho Y, Miyoshi G, Sakata R, Kageyama R. (2001a). Hes7: A bHLHtype repressor gene regulated by Notch and expressed in the presomitic mesoderm. *Genes Cells* 6:175–185
10. Bier, E., Vässin, H., Younger-Shepherd, S., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1992). *deadpan*, an essential pan-neural gene in *Drosophila*, encodes a helix-loop-helix protein similar to the *hairy* gene product. *Genes Dev.* 6, 2137-2151.
11. Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401-415.
12. Bray S (1998) Notch signalling in *Drosophila*: three ways to use a pathway. *Semin Cell Dev Biol* 9: 591-597.
13. Cabrera, C. V. & Alonso, M. C. (1991) Transcriptional activation by heterodimers of the *achaete-scute* and *daughterless* gene products of *Drosophila*. *EMBO J.* 10, 2965–2973.
14. Campos Ortega 1993 in *The Development of Drosophila melanogaster Vol II* (edited by Michael Bate and Alfonso Martinez Arias) CSHL Press NY
15. Campos-Ortega, J. A. (1993). Early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. In "The Development of *Drosophila melanogaster*" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
16. Campuzano, S. and Modolell, J. (1992). Patterning of the *Drosophila* nervous system: the *achaete-scute* gene complex. *Trends Genet.* 8, 202-208.
17. Castella P, Sawai S, Nakao K, Wagner JA, Caudy M. (2000). HES-1 repression of differentiation and proliferation in PC12 cells: Role for the helix 3-helix 4 domain in transcription repression. *Mol Cell Biol* 20:6170–6183.
18. Castella P, Wagner JA, Caudy M (1999) Regulation of hippocampal neuronal differentiation by the basic helix-loop-helix transcription factors HES-1 and MASH-1. *J. Neurosci. Res.* 56: 229-40.
19. Chen G, Fernandez J, Mische S, Courey AJ. (1999). A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the core-repressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev* 13:2218 – 2230.
20. Chen H, Thiagalingam A, Chopra H, Borges MW, Feder JN, Nelkin BD, Baylin SB, Ball DW. (1997). Conservation of the *Drosophila* lateral inhibition pathway in human lung cancer: A hairy-related protein (HES-1) directly represses *achaete-scute* homolog-1 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5355–5360.

21. Chin MT, Maemura K, Fukumoto S, Jain MK, Layne MD, Watanabe M, Hsieh CM, Lee ME. (2000). Cardiovascular basic helix loop helix factor 1, a novel transcriptional repressor expressed preferentially in the developing and adult cardiovascular system. *J Biol Chem* 275:6381–6387.
22. Conlon RA, Reaume AG, Rossant J. (1995). Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* 121:1533–1545.
23. Cooper, M. T., Tyler, D. M., Furriols, M., Chalkiadaki, A., Delidakis, C. and Bray, S. (2000). Spatially Restricted Factors Cooperate with Notch in the Regulation of Enhancer of split Genes. *Dev. Biol.* 221, 390-403.
24. Cubas, P., J.F. de Celis, S. Campuzano, and J. Modolell. 1991. Proneural clusters of *achaete-scute* expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. *Genes & Dev.* 5: 996–1008.
25. Culi J, Modolell J (1998) Proneural gene self-stimulation in neural precursors: an essential mechanism for sense organ development that is regulated by Notch signaling. *Genes Dev.* 12: 2036-2047.
26. Davis RL, Turner DL (2001) Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* 20: 8342-8357.
27. Dawson SR, Turner DL, Weintraub H, Parkhurst SM. 1995. Specificity for the hairy/enhancer of split basic helix-loop-helix (bHLH) proteins maps outside the bHLH domain and suggests two separable modes of transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 15:6923–6931.
28. de Celis, J., de Celis, J., Ligoxygakis, P., Preiss, A., Delidakis, C. and Bray, S. (1996). Functional relationships between *Notch*, *Su(H)* and the bHLH genes of the *E(spl)* complex: the *E(spl)* genes mediate only a subset of *Notch* activity during imaginal development. *Development* 122, 2719-2728.
29. de la Pompa JL, Wakeham A, Correia KM, Samper E, Brown S, Aguilera RJ, Nakano T, Honjo T, Mak TW, Rossant J, Conlon RA. (1997). Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* 124:1139–1148.
30. Delidakis, C. and Artavanis-Tsakonas, S. (1992). The *Enhancer of split [E(spl)]* locus of *Drosophila* encodes seven independent helix-loop-helix proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8731-8735.
31. Delidakis, C., Preiss, A., Hartley, D. A. and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Two genetically and molecularly distinct functions involved in early neurogenesis reside within the *Enhancer of split* locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 129, 803-823.
32. Doe, C. Q., S. Fuerstenberg, et al. (1998). "Neural stem cells: from fly to vertebrates." *J Neurobiol* 36(2): 111-27.
33. Dominguez M, Campuzano S: 1993 *asense*, a member of the *Drosophila achaete-scute* complex, is a proneural and neural differentiation gene. *EMBO J*, 12:2049-2060.
34. Donovan, J., Kordylewska, A., Jan, Y. N. & Utset, M. F. (2002) *Curr. Biol.* 12,1605–1610.
35. Dubnicoff, T., Valentine, S. A., Chen, G., Shi, T., Lengyel, J. A., Paroush, Z. and Courey, A. J. (1997). Conversion of dorsal from an activator to a repressor by the global corepressor Groucho. *Genes Dev.* 11, 2952-2957.
36. Dunwoodie SL, Clements M, Sparrow DB, Sa X, Conlon RA, Beddington RS. 2002. Axial skeletal defects caused by mutation in the spondylocostal dysplasia/pudgy gene DII3 are associated with disruption of the segmentation clock within the presomitic mesoderm.
37. Egan SE, St-Pierre B, Leow CC. 1998. Notch receptors, partners and regulators: From conserved domains to powerful functions. *CurrTopics Microbiol Immunol* 228:273–324.
38. Emery, J. F. and Bier, E. (1995). Specificity of CNS and PNS regulatory subelements comprising pan-neural enhancers of the deadpan and scratch genes is achieved by repression. *Development* 121, 3549-3560.
39. Ephrussi, A., G. M. Church, S. Tonegawa, and W. Gilbert. 1985. B-lineagespecific interactions of an immunoglobulin enhancer with cellular factors *in vivo*. *Science* 227:134–140.
40. Erickson JW, Cline TW (1993) A bZIP protein, Sisterless-a, collaborates with bHLH transcription factors early in *Drosophila* development to determine sex. *Genes Dev.* 7: 1688-1702.

41. Fisher A , Caudy M (1998) The function of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions. *BioEssays* 20: 298-306.
42. Fisher AL, Ohsako S , Caudy M (1996) The WRPW motif of the Hairy-related basic-helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4 amino acid transcription repression and protein-protein interaction domain. *Mol. Cell. Biol.* 16: 2670-2677.
43. Garcia-Bellido, A (1979). Genetic analysis of the achaete-scute system of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 91, 491–520.
44. Gessler, M., Knobloch, K.-P., Helisch, A., Amann, K., Schumacher, N., Rohde, E., Fischer, A. & Leimeister, C. (2002) *Curr. Biol.* 12, 1601–1604.
45. Ghysen, A. & Dambly-Chaudiere, C (1988). From DNA to form: the achaete-scute complex. *Genes Dev.* 2, 495–501.
46. Giagtzoglu N, Alifragis P, Koumbanakis KA, Delidakis C (2003) Two modes of recruitment of E(spl) repressors onto target genes. *Development* 130: 259-70.
47. Giebel, B. and Campos-Ortega, J. A. (1997). Functional dissection of the *Drosophila* Enhancer of split protein, a suppressor of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6250-6254.
48. Gomez-Skarmeta, J. L., Rodriguez, I., Martinez, C., Culi, J., Ferrés-Marco, D., Beamonte, D. and Modolell, J. (1995). Cis-regulation of *achaete* and *scute*: shared enhancer-like elements drive their coexpression in proneural clusters of the imaginal discs. *Genes Dev.* 9, 1869-1882.
49. Gonzalez, F. *et al.* (1989) Molecular analysis of the *asense* gene, a member of the *achaete-scute* complex of *Drosophila melanogaster*, and its novel role in optic lobe development. *EMBO J.* 8, 3553–3562.
50. Goodman and Doe 1993 in *The Development of Drosophila melanogaster Vol II* (edited by Michael bate and Alfonso Martines Arias) CSHL Press NY
51. Goulding, S. E., White, N. M. & Jarman, A. P. (2000a) *cato* encodes a basic helix–loop–helix transcription factor implicated in the correct differentiation of *Drosophila* sense organs. *Dev. Biol* 221, 120–131.
52. Goulding, S. E., zur Lage, P. & Jarman, A. P. (2000b) *amos*, a proneural gene for *Drosophila* olfactory sense organs that is regulated by *lozenge*. *Neuron* 25, 69–78.
53. Greenwald I. 1998. LIN-12/Notch signaling: Lessons from worms and flies. *Genes Dev* 12:1751–1762
54. Greenwald I. 1998. LIN-12/Notch signaling: Lessons from worms and flies. *Genes Dev* 12:1751–1762
55. Hamada Y, Kadokawa Y, Okabe M, Ikawa M, Coleman JR, Tsujimoto Y. 1999. Mutation in ankyrin repeats of the mouse Notch2 gene induces early embryonic lethality. *Development* 126:3415–3424.
56. Hartenstein AY, Rugendorff A, Tepass U, Hartenstein V. 1992. The function of the neurogenic genes during epithelial development in the *Drosophila* embryo. *Development* 116:1203–1220.
57. Hartenstein, V., Rudloff, E., and Campos-Ortega, J. A. (1987). The pattern of proliferation of the neuroblasts in the wild-type embryo of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 196
58. Hassan BA, Bellen HJ (2000) Doing the MATH: is the mouse a good model for fly development? *Genes Dev.* 14: 1852-65.
59. Heitzler, P. and P. Simpson. 1991. The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* 64: 1083–1092.
60. Heitzler, P., M. Bourouis, L. Ruel, C. Carteret, and P. Simpson. 1996. Genes of the *Enhancer of split* and *achaete-scute* complexes are required for a regulatory loop between *Notch* and *Delta* during lateral signalling in *Drosophila*. *Development* 122: 161–171.
61. Henderson AM, Wang SJ, Taylor AC, Aitkenhead M, Hughes CC. 2001. The basic helix-loop-helix transcription factor HESR1 regulates endothelial cell tube formation. *J Biol Chem* 276:6169–6176.
62. Hinz, U., Giebel, B. and Campos-Ortega, J. A. (1994). The basic-helix-loop-helix domain of *Drosophila* Lethal of Scute protein is sufficient for proneural function and activates neurogenic genes. *Cell* 76, 77–87.

63. Hrabe de Angelis M, McIntyre J, Lind, Gossler A. 1997. Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature* 386:717–721.
64. Hrabe de Angelis M, McIntyre J, Lind, Gossler A. 1997. Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature* 386:717–721.
65. Huang, F., C. Dambly-Chaudiere, and A. Ghysen. 1991. The emergence of sense organs in the wing disc of *Drosophila*. *Development* 111: 1087–1095.
66. Huang, M. L., Hsu, C. H. & Chien, C. T. (2000) The proneural gene *amos* promotes multiple dendritic neuron formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Neuron* 25, 57–67.
67. Ishibashi M, Ang SL, Shiota K, Nakanishi S, Kageyama R, Guillemot F. 1995. Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev* 9:3136–3148
68. Iso T, Chung G, Hamamori Y, Kedes L. 2002. HERP1 Is a Cell Type specific Primary Target of Notch. *J Biol Chem* 277:6598–6607.
69. Iso T, Sartorelli V, Chung G, Shichinohe T, Kedes L, Hamamori Y. 2001α Herp, a new primary target of notch regulated by ligand binding. *Mol Cell Biol* 21:6071–6079.
70. Iso T, Sartorelli V, Poizat C, Iezzi S, Wu HY, Chung G, Kedes L, Hamamori Y. 2001β. Herp, a novel heterodimer partner of *hes/e(spl)* in notch signaling. *Mol Cell Biol* 21:6080–6089.
71. Iso T., Kedes L., Hamamori Y. HES and HERP Families: (2003) Multiple Effectors of the Notch Signaling Pathway. *J. Cell. Physiol.* 194:237–255 (2003)
72. Jafar-Nejad H, Acar M, Nolo R, Lacin H, Pan H, Parkhurst SM, Bellen HJ (2003) Senseless acts as a binary switch during sensory organ precursor selection. *Genes Dev.* 17: 2966-2978.
73. Jan and Jan 1993 in *The Development of Drosophila melanogaster Vol II* (edited by Michael Bate and Alfonso Martinez Arias) CSHL Press NY
74. Jan, Y. N. & Jan, L. Y. (1994) Genetic control of cell fate specification in *Drosophila* peripheral nervous system. *Annu.Rev. Genet.* 28, 373–393.
75. Jarman, A. P., Brand, M., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1993). The regulation and function of the helix-loop-helix gene, *asense*, in *Drosophila* precursors. *Development* 119, 19-29.
76. Jennings BH, Preiss, A, Delidakis C, Bray S (1994) The Notch signalling pathway is required for Enhancer of split bHLH protein expression during neurogenesis in the *Drosophila* embryo. *Development* 120, 3537-3548.
77. Jennings, B. H., Tyler, D. M. and Bray, S. J. (1999). Target specificities of *Drosophila* enhancer of split basic helix-loop-helix proteins. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4600-4610.
78. Jiang R, Lan Y, Chapman HD, Shawber C, Norton CR, Serreze DV, Weinmaster G, Gridley T. 1998. Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice. *Genes Dev* 12:1046–1057.
79. Jiménez, G. and Ish-Horowicz, D. (1997). A chimeric Enhancer-of-split transcriptional activator drives neural development and *achaete-scute* expression. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4355-4362.
80. Kageyama, R. and Nakanishi, S. (1997). Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 659-665.
81. Kokubo H, Lun Y, Johnson RL. 1999. Identification and expression of a novel family of bHLH cDNAs related to *Drosophila* hairy and enhancer of split. *Biochem Biophys Res Commun* 260:459–465.
82. Krebs LT, Xue Y, Norton CR, Shutter JR, Maguire M, Sundberg JP, Gallahan D, Closson V, Kitajewski J, Callahan R, Smith GH, Stark KL, Gridley T. 2000. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev* 14:1343–1352.
83. Ktistaki, E. and Talianidis, I. (1997). Modulation of hepatic gene expression by hepatocyte nuclear factor 1. *Science* 277, 109-112.
84. Kusumi K, Sun ES, Kerrebrock AW, Bronson RT, Chi DC, Bulotsky MS, Spencer JB, Birren BW, Frankel WN, Lander ES. 1998. The mouse pudgy mutation disrupts Delta homologue Dll3 and initiation of early somite boundaries. *Nat Genet* 19:274–278.

85. Lawson, N. D. *et al.* (2001) Notch signaling is required for arterial–venous differentiation during embryonic vascular development. *Development* 128, 3675–3683.
86. Lecourtois, M. and Schweisguth, F. (1995). The neurogenic Suppressor of Hairless DNA-binding protein mediates the transcriptional activation of the *Enhancer* of split Complex genes triggered by Notch signaling. *Genes Dev.* 9, 2598-2608.
87. Ledent, V. and Vervoort, M. (2001). The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis. *Genome Res.* 11, 754-770.
88. Lehman, R., Jiménez, F., Dietrich, U. and Campos-Ortega, J. A. (1983). On the phenotype and development of mutants of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Roux Arch. Dev. Biol.* 192, 62-74.
89. Leimeister C, Dale K, Fischer A, Klamt B, de Angelis MH, Radtke F, McGrew MJ, Pourquie O, Gessler M. 2000a. Oscillating Expression of c-Hey2 in the presomitic mesoderm suggests that the segmentation clock may use combinatorial signaling through multiple interacting bHLH factors. *Development* 227:91–103.
90. Leimeister C, Externbrink A, Klamt B, Gessler M. 1999. Hey genes: A novel subfamily of hairy- and enhancer of split related genes specifically expressed during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 85:173–177.
91. Leimeister C, Schumacher N, Steidl C, Gessler M. 2000b. Analysis of HeyL expression in wild-type and Notch pathway mutant mouse embryos. *Mech Dev* 98:175–178.
92. Ligoxygakis, P., Bray, S. J., Apidianakis, Y. and Delidakis, C. (1999). Ectopic expression of individual *E(spl)* genes has differential effects on different cell fate decisions and underscores the biphasic requirement for notch activity in wing margin establishment in *Drosophila*. *Development* 126, 2205-2214.
93. Maier MM, Gessler M. 2000. Comparative analysis of the human and mouse Hey1 promoter: Hey genes are new Notch target genes. *Biochem Biophys Res Commun* 275:652–6560.
94. Martin-Bermudo, M. D., Carmena, A. and Jiménez, F. (1995). Neurogenic genes control gene expression at the transcriptional level in early neurogenesis and in mesectoderm specification. *Development* 121, 219-224.
95. Martinez, C., Modolell, J. and Garrell, J. (1993). Regulation of the proneural gene *achaete* by helix-loop-helix proteins. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3514-3521.
96. Massari, M. E. and Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol. Cell. Biol.* 20, 429-440.
97. McCright B, Gao X, Shen L, Lozier J, Lan Y, Maguire M, Herzlinger D, Weinmaster G, Jiang R, Gridley T. 2001. Defects in development of the kidney, heart and eye vasculature in mice homozygous for a hypomorphic Notch2 mutation. *Development* 128:491–502.
98. Merika M, Thanos D (2001) Enhanceosomes. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 11: 205-208.
99. Moore, A. W. *et al.* (2000) A genomewide survey of basic helix–loop–helix factors in *Drosophila*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 10436–10441.
100. Murre, C., McCaw, P. S. & Baltimore, D. (1989a) A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56, 777–783
101. Murre, C., Schonleber McCaw, P., Vaessin, H., Cauchy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Hauschka, S. D., Lassar, A. B., Weintraub, H. and Baltimore, D. (1989b). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544.
102. Nakagawa O, McFadden DG, Nakagawa M, Yanagisawa H, Hu T, Srivastava D, Olson EN. 2000. Members of the HRT family of basic helix-loop-helix proteins act as transcriptional repressors downstream of Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13655–13660.
103. Nakagawa O, Nakagawa M, Richardson JA, Olson EN, Srivastava D. 1999. HRT1, HRT2, and HRT3: A new subclass of bHLH transcription factors marking specific cardiac, somitic, and pharyngeal arch segments. *Dev Biol* 216:72–84.
104. Nakao, K. and Campos-Ortega, J. A. (1996). Persistent expression of genes of the *Enhancer of split* Complex suppresses neural development in *Drosophila*. *Neuron* 16, 275-286.

105. Nellesen, D. T., Lai, E. C. and Posakony, J. W. (1999). Discrete enhancer elements mediate selective responsiveness of *Enhancer of split Complex* genes to common transcriptional activators. *Dev. Biol.* 213, 33-53.
106. Nolo, R., Abbott, L. A. and Bellen, H. J. (2000). Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in *Drosophila*. *Cell* 102, 349-362.
107. Oellers, N., Dehio, M. and Knust, E. (1994). bHLH proteins encoded by the *Enhancer of split* complex of *Drosophila* negatively interfere with transcriptional activation mediated by proneural genes. *Mol. Gen. Genet.* 244, 465-473.
108. Ohsako, S., Hyer, J., Panganiban, G., Oliver, I. and Caudy, M. (1994). hairy function as a DNA binding helix-loop-helix repressor of *Drosophila* sensory organ formation. *Genes Dev.* 8, 2743-2755.
109. Ohtsuka T, Ishibashi M, Gradwohl G, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R. 1999. Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J* 18:2196–21207.
110. Paroush Z, Finley RLFJ, Kidd T, Wainwright SM, Ingham P, W., Brent R , Ish-Horowicz D (1994) Groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with Hairy-related bHLH proteins. *Cell* 79: 805-815.
111. Pavlopoulos, E., Pitsouli, C., Klueg, K. M., Muskavitch, M. A., Moschonas, N. K. and Delidakis, C. (2001). neuralized encodes a peripheral membrane protein involved in Delta signaling and endocytosis. *Dev Cell* 1, 807-816.
112. Peyrefitte, S., Kahn, D. & Haenlin, M. (2001) New members of the *Drosophila* Myc transcription factor subfamily revealed by a genome-wide examination for basic helix-loop-helix genes. *Mech. Dev.* 104, 99–104.
113. Quan X-J, Denayer T, Yan J, Jafar-Nejad H, Philippi A, Lichtarge O, Vleminckx K , Hassan BA (2004) Evolution of neural precursor selection: functional divergence of proneural proteins. *Development* 131: 1679-1689.
114. Quong MW, Massari ME, Zwart R, Murre C (1993) A new transcriptional-activation motif restricted to a class of helix-loop-helix proteins is functionally conserved in both yeast and mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 13: 792-800.
115. Sakata Y, Kamei C., Nakagami H, Bronson R, Liao J.K, Chin M.T (2002) Ventricular septal defect and cardiomyopathy in mice lacking the transcription factor CHF1_Hey2. *Proc. Nat. Acad. USA* 99: 25, 16197–16202
116. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. CSHL Lab. Press, Plainview, NY.
117. Sasai Y, Kageyama R, Tagawa Y, Shigemoto R , Nakanishi S (1992) Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila hairy* and *Enhancer of split*. *Genes Dev.* 6: 2620-2634.
118. Satou T, Bae SK, Inoue T, Inoue C, Miyoshi G, Tomita K, Bessho Y, Hashimoto N, Kageyama R. 2001. The basic helix-loop-helix gene *hesr2* promotes gliogenesis in mouse retina. *J Neurosci* 21:1265–1273.
119. Schrons, H., Knust, E. and Campos-Ortega, J. A. (1992). The *Enhancer of split* Complex and Adjacent Genes in the 96F Region of *Drosophila melanogaster* Are Required for Segregation of Neural and Epidermal Progenitor Cells. *Genetics* 132, 481-503.
120. Sidow A, Bulotsky MS, Kerrebrock AW, Bronson RT, Daly MJ, Reeve MP, Hawkins TL, Birren BW, Jaenisch R, Lander ES. 1997. *Serrate2* is disrupted in the mouse limb-development mutant syndactylism. *Nature* 389:722–725.
121. Simpson, P. 1990. Lateral inhibition and the development of the sensory bristles of the adult peripheral nervous system of *Drosophila*. *Development* 109: 509–519.
122. Simpson, P. 1997. Notch signalling in development: On equivalence groups and asymmetric developmental potential. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7: 537–542.
123. Singson, A., Leviten, M. W., Bang, A. G., Hua, X. H. and Posakony, J. W. (1994). Direct downstream targets of proneural activators in the imaginal disc include genes involved in lateral inhibitory signaling. *Genes Dev.* 8, 2058-2071.
124. Skeath, J. B. and Carroll, S. B. (1992). Regulation of proneural gene expression and cell fate during neuroblast segregation in the *Drosophila* embryo. *Development* 114, 939-946.

125. Steidl C, Leimeister C, Klamt B, Maier M, Nanda I, Dixon M, Clarke R, Schmid M, Gessler M. 2000. Characterization of the human and mouse HEY1, HEY2, and HEYL genes: Cloning, mapping, and mutation screening of a new bHLH gene family. *Genomics* 66:195–203.
126. Sun J, Kamei CN, Layne MD, Jain MK, Liao JK, Lee ME, Chin MT. 2001. Regulation of myogenic terminal differentiation by the hairy related transcription factor CHF2. *J Biol Chem* 276:18591–18596.
127. Swevers, L., Cherbas, L., Cherbas, P. and Iatrou, K. (1996). Bombyx EcR (BmEcR) and Bombyx USP (BmCF1) combine to form a functional ecdysone receptor. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 217-221.
128. Swiatek PJ, Lindsell CE, del Amo FF, Weinmaster G, Gridley T. 1994. Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes Dev* 8:707–719.
129. Tata, F. and Hartley, D. A. (1995). Inhibition of cell fate in *Drosophila* by *Enhancer of split* genes. *Mech. Dev.* 51, 305-315.
130. Teramoto M, Nakamasu K, Noshiro M, Matsuda Y, Gotoh O, Shen M, Tsutsumi S, Kawamoto T, Iwamoto Y, Kato Y. 2001. Gene structure and chromosomal location of a human bHLH transcriptional factor DEC1 x Stra13 x SHARP-2/BHLHB2. *J Biochem (Tokyo)* 129:391–396.
131. Tietze, K., Oellers, N. and Knust, E. (1992). *Enhancer of split^D*, a dominant mutation of *Drosophila*, and its use in the study of functional domains of a helix-loop-helix protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6152-6156.
132. Valentine, S. A., Chen, G., Shandala, T., Fernandez, J., Mische, S., Saint, R. and Courey, A. J. (1998). Dorsal-mediated repression requires the formation of a multiprotein repression complex at the ventral silencer. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6584-6594.
133. Van Doren, M., Bailey, A. M., Esnayra, J., Ede, K. and Posakony, J. W. (1994). Negative regulation of proneural gene activity: Hairy is a direct transcriptional repressor of *achaete*. *Genes Dev.* 8, 2729-2742.
134. Van Doren, M., Powell, P. A., Pasternak, D., Singson, A. and Posakony, J. W. (1992). Spatial regulation of proneural gene activity: auto- and cross-activation of *achaete* is antagonized by *extramacrochaete*. *Genes Dev.* 6, 2592-2605.
135. Vasilias D, Stern CD. 2000. Expression of mouse HES-6, a new member of the Hairy/Enhancer of split family of bHLH transcription factors. *Mech Dev* 98:133–137
136. Villares, R. & Cabrera, C. V. (1987) The *achaete-scute* gene complex of *D. melanogaster*: conserved domains in a subset of genes required for neurogenesis and their homology to *myc*. *Cell* 50, 415–424.
137. Wainwright SM, Ish-Horowicz D. 1992. Point mutations in the *Drosophila* hairy gene demonstrate in vivo requirements for basic, helix-loop-helix, and WRPW domains. *Mol Cell Biol* 12:2475–2483.
138. Wech I., Bray S., Delidakis C and Preiss A. (1999) Distinct expression patterns of different Enhancer of split bHLH genes during embryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Dev Genes Evol* 209:370–375
139. Weinstein, B. M., Stemple, D. L., Driever, W. & Fishman, M. C. (1995). Gridlock, a localized heritable vascular patterning defect in the zebrafish. *Nature Med.* 1, 1143–1147.
140. Xiong, W. C. and C. Montell (1995). "Defective glia induce neuronal apoptosis in the repo visual system of *Drosophila*." *Neuron* 14(3): 581-90.
141. Xue Y, Gao X, Lindsell CE, Norton CR, Chang B, Hicks C, Gendron- Maguire M, Rand EB, Weinmaster G, Gridley T. 1999. Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum Mol Genet* 8:723–730.
142. Yang, D., Lu, H., Hong, Y., Jinks, T. M., Estes, P. A. and Erickson, J. W. (2001). Interpretation of X chromosome dose at *Sex-lethal* requires non-E-box sites for the basic helix-loop-helix proteins SISB and daughterless. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1581-1592.
143. Zhong TP, Childs S, Leu JP, Fishman MC. 2001. Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature* 414:216–220.
144. Zhong TP, Rosenberg M, Mohideen MA, Weinstein B, Fishman MC. 2000. Gridlock, an HLH gene required for assembly of the aorta in zebrafish. *Science* 287:1820–1824.
145. Yao, K. M., M. L. Samson, et al. (1993). "Gene *elav* of *Drosophila melanogaster*: a prototype for neuronal-specific RNA binding protein gene family that is conserved in flies and humans." *J Neurobiol* 24(6): 723-39.